



NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR ADENOVIRUS: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS ANTIVIRALES

TESIS DOCTORAL
de
PABLO MARTÍNEZ AGUADO
12/10/2016

El Prof. Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla, el Dr. Javier Sánchez Céspedes, Doctor en Biología, adscrito al Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla y la Dra. Margarita Luisa Vega Holm, Doctora en Farmacia, adscrita al Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que lleva por título *“Nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones por adenovirus: síntesis y evaluación de pequeñas moléculas antivirales”* ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado en Biología Don Pablo Martínez Aguado, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Sevilla a 12 de octubre de 2016.

Jerónimo Pachón Díaz

Javier Sánchez Céspedes

Margarita Vega Holm

ÍNDICE

I. ABSTRACT.....	21
II. INTRODUCCIÓN	24
1. Adenovirus	25
1.1. Clasificación y estructura del HAdV.....	25
1.2. Organización del genoma del HAdV.....	27
1.3. Ciclo de infección del HAdV	29
2. Impacto clínico y tratamiento de las infecciones por adenovirus	31
2.1. Distribución y transmisión del HAdV.....	31
2.2. Impacto clínico.....	32
2.2.1. Infecciones en pacientes inmunocompetentes.....	32
2.2.2. Infecciones en pacientes inmunodeprimidos.....	34
3. Perspectivas en el descubrimiento y desarrollo de antivirales.....	36
3.1. Artículo I. Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies.....	36
3.2. Antivirales derivados de piperazina.....	45
3.3. Inhibidores dirigidos a la AVP.....	47
III. JUSTIFICACIÓN	50
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54

V. RESULTADOS	58
1. Cribado y caracterización de moléculas con actividad anti-HAdV	59
1.1. Artículo II. New 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives as potential inhibitors of adenovirus infection. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships.....	59
1.2. Resultados adicionales.....	80
1.2.1. Ensayo de inhibición de la polimerasa de phi29 (ϕ 29) mediante PCR cuantitativa.....	80
2. Desarrollo de inhibidores de la AVP de la proteasa de adenovirus (AVP)...	82
2.1. Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores específicos de la AVP: inmunofluorescencia indirecta.	82
2.1.1. Resultados	85
2.1.1.1. Análisis del impacto de los compuestos evaluados en la expresión de los genes tempranos (E4orf3) y tardíos (proteínas estructurales) de HAdV	85
2.1.1.2. Análisis de la intensidad de la citoqueratina celular	89
2.2. Caracterización estructural de la AVP: Obtención de las estructuras cristalinas de los complejos de AVP-pVIc y AVP-pVIc-ADN	91
2.2.1. Obtención de los complejos AVP-pVIc	91
2.2.2. Cristalización y obtención de datos mediante rayos-X.....	92
2.2.3. Solución de la estructura y refinamiento	93
2.2.4. Obtención de los complejos AVP-pVIc-ADN.....	95
VI. DISCUSIÓN	99
1. Caracterización estructural de los compuestos: espectroscopía de resonancia magnética nuclear	101

1.1.	Primera generación de compuestos	101
1.2.	Segunda generación de compuestos.....	104
1.3.	Tercera generación de compuestos.....	107
1.4.	Potenciales inhibidores específicos de la AVP.....	110
2.	Inhibición de la infección de HAdV por los derivados de 4-Acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina.....	112
2.1.	Primera generación.....	112
2.2.	Segunda generación	113
2.3.	Tercera generación.....	114
3.	Impacto en la entrada de HAdV	116
4.	Impacto en la replicación de HAdV.....	118
5.	Impacto en la replicación de HCMV	119
6.	Evaluación de la inhibición de los compuestos derivados de 2-fenilpiperazina sobre la polimerasa de phi29 (ϕ 29)	119
7.	Evaluación de nuevos inhibidores específicos de la proteasa del HAdV (AVP): síntesis y determinación estructural	120
7.1.	Análisis de la expresión de los genes tempranos y tardíos de HAdV..	122
7.2.	Efecto de los compuestos sobre la degradación de la red de citoqueratina celular	123
8.	Cristalización de la estructura del complejo AVP-pVlc-ADN.....	124
VII. CONCLUSIONS.....		128
VIII. ANEXO		132
1.	Relación de productos sintetizados.....	133

1.1. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina: primera generación (10-26).....	133
1.2. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina: segunda generación (27-41).....	135
1.3. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina: tercera generación (46-65).....	137
1.4. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina: potenciales inhibidores específicos de la AVP (68-72)	139
2. Materiales y métodos.....	140
2.1. Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores específicos de la AVP: inmunofluorescencia indirecta	140
2.1.1. Librerías de compuestos.....	140
2.1.1.1. Procedimiento general 4. Reacción de N-acilación quimioselectiva de las 2-fenilpiperazinas (66, 67).....	140
2.1.1.2. Procedimiento general 5. Síntesis de los urea derivados (68-71)	142
2.1.1.3. Procedimiento general 6. Síntesis del disulfonamida derivado	72 144
2.1.2. Células y virus	145
2.1.3. Anticuerpos.....	146
2.1.4. Técnica de inmunofluorescencia indirecta.....	146
2.1.5. Microscopía.....	147
2.1.6. Análisis estadístico.....	149
2.1.6.1. Expresión génica de genes tempranos y tardíos.....	149
2.1.6.2. Estudio de la intensidad relativa de citoqueratina 18 celular	149
2.1.6.3. Correlación entre la expresión de los genes tempranos y tardíos	149

2.2.	Caracterización estructural de la AVP: Obtención de las estructura cristalinas de los complejos de AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN	150
2.2.1.	Expresión y purificación de la AVP.....	150
2.2.1.1.	Expresión de la AVP.....	150
2.2.1.2.	Purificación de la AVP.....	150
2.3.	Método de difusión por vapor: gota sentada.....	152
3.	Composición química de los búffers fabricados empleados en los ensayos para la obtención de los complejos cristalinos AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN.....	154
3.1.	Búffer HPLS1.....	154
3.2.	Búffer HPLS2.....	156
3.3.	Búffer PEG INFAC.....	158
4.	Espectros de RMN	160
4.1.	Compuestos seleccionados 46, 59, 60, 63, 64 y 65 derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina.....	160
4.2.	Inhibidores potenciales específicos de la AVP derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos 68-72).....	166
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies, tipos y tropismos tisulares de HAdV. Adaptada de T. Lion, 2014.	25
Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la actividad de los compuestos 46, 59, 60, 63, 64 y 65 a 50 μ M sobre la ADN polimerasa de Φ 29 comparados con un control en presencia de DMSO.	81
Tabla 3. Datos de difracción de rayos-X y estadísticas de refinamiento.....	94
Tabla 4. Datos de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos 10-26 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	102
Tabla 5. Datos de ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos 10-26 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	103
Tabla 6. Datos de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos 27-41 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	105
Tabla 7. Datos de ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos 27-41 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	106
Tabla 8. Datos de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos 47-65 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. ^a Espectro adquirido empleando CDCl_3 como disolvente.	108

Tabla 9. Datos de ¹³ C RMN (125 MHz, DMSO-d ₆) para los compuestos 46-65 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. ^a Espectro adquirido empleando CDCl ₃ como disolvente.....	109
Tabla 10. Datos de ¹ H RMN (500 MHz, DMSO-d ₆) para los compuestos 68-72 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	110
Tabla 11. Datos de ¹³ C RMN (125 MHz, DMSO-d ₆) para los compuestos 68-72 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.	111
Tabla 12. Primera generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina (compuestos 10-26).....	134
Tabla 13. Segunda generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina (compuestos 27-41).....	136
Tabla 14. Tercera generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos 46-65).....	139
Tabla 15. Inhibidores potenciales específicos de la AVP derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos 68-72).....	139
Tabla 16. Composición química y distribución del búffer HPLS1 en una placa de 96 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilenglicol.....	156
Tabla 17. Composición química y distribución del búffer HPLS2 en una placa de 96 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilenglicol.....	158

Tabla 18. Composición química y distribución del búffer PEG INFAC en una placa de 48 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilénglicol.

.....159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del Adenovirus.	26
Figura 2. Esquema del genoma de HAdV5. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Adaptada de Bratati S. et al., 2014.	28
Figura 3. Representación esquemática del proceso de entrada y transporte al núcleo de HAdV5. Adaptada de Coughlan L. et al., 2010.	30
Figura 4. Ejemplos de la diversidad estructural y actividades biológicas de los derivados de piperazina. (a) Actividad anticancerígena, 1-(3,5-dimetoxifenil)-4-[(6-fluoro-2-metoxiquinoxalin-3-il)aminocarbonil]piperazina; (b) Actividad antiviral, 1-[(2R)-4-benzoi l-2-metilpiperazin-1-il]-2-(4-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il)etano-1,2-diona; (c) Actividad antibacteriana; 4-(2-Hidroxi-3-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona; (d) Actividad antituberculosa; 4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)(3,4-dimetilfenil)metanona.	45
Figura 5. Análisis de inmunofluorescencia con marcaje específico de anticuerpos contra la citoqueratina 18 en células HeLa sanas (a), e infectadas con HAdV a las 24 (b) y 36 horas postinfección (c). Adaptado de Chen P. et al., 1993.	82
Figura 6. Ejemplo de marcaje en células HeLa sanas (a) e infectadas con dl309 (b) tratadas con DMSO con anticuerpos dirigidos contra citoqueratina 18 celular (verde), y E4orf3 (rojo) y proteínas tardías (verde) de HAdV. Los núcleos se definieron con la tinción DAPI (azul).	84

Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes mostrando el porcentaje respecto a las muestras tratadas con DMSO de la intensidad media de fluorescencia de la proteína de expresión temprana E4orf3 en células HeLa infectadas con dl309 y tratadas con 50µM de cada uno de los compuestos. Las cajas muestran los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea sólida horizontal), los percentiles 25 y 50 (línea externa) y las observaciones máximas y mínimas (bigotes). *** p < 0,01, ** p < 0,05 ' p < 0,1 vs. DMSO..... 86

Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes mostrando el porcentaje respecto a las muestras tratadas con DMSO de la intensidad media de fluorescencia de las proteínas virales de expresión tardía (proteínas de la cápsida) en células HeLa infectadas con dl309 y tratadas con 50µM de cada uno de los compuestos. Las cajas muestran los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea sólida horizontal), los percentiles 25 y 50 (línea externa) y las observaciones máximas y mínimas (bigotes). *** p < 0,01, ' p < 0,1 vs. DMSO. 87

Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de expresión de E4orf3 y las proteínas tardías de la cápsida de HAdV. Se muestran los valores logarítmicos de la intensidad media de fluorescencia para las proteínas tempranas y tardías en presencia de los compuestos o la misma cantidad de DMSO. Los límites del eje x se modificaron para dar cabida a todo el rango de expresión E4ORF3 (valores del eje x). Los límites del eje y se fijaron para permitir la comparación directa de la expresión génica tardía (valores del eje y) entre los paneles. Se empleó una línea curva continua para el test de correlación. “ns” indica ausencia de correlación entre ambas variables..... 88

Figura 10. Ratio de la intensidad de expresión de citoqueratina celular en células infectadas (dl309) con respecto a las no infectadas, tratados con DMSO o los distintos compuestos. La banda azul muestra la reducción causada en la intensidad relativa de citoqueratina 18 debida a la infección por HAdV (dl309). Los valores superiores a 1 indican que la intensidad de la tinción de citoqueratina es superior en las células infectadas respecto a las no infectadas. “None” indica ausencia de tratamiento. Los valores de la $p > 0,05$ indicados con “*” muestran aquellos compuestos que previenen de la reducción en la intensidad de citoqueratina 18 a consecuencia de la infección de HAdV. 90

Figura 11. Formaciones cristalinas de los complejos AVP-pVlc en forma de largas barras hexagonales tras 24h de incubación a 4°C en un medio que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc (a). Detalle de las estructuras cristalinas a mayor aumento (b). 93

Figura 12. Modelo tridimensional AVP-pVlc obtenida tras solución y refinamiento de la estructura. Estructura de la AVP (verde) y el cofactor pVlc (naranja). 94

Figura 13. Obtención de “agujas” de los complejos AVP-pVlc-ADN tras 24h de incubación a 4°C en presencia de nucleótidos de 12 pb y el búffer en un medio que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc..... 96

Figura 14. Síntesis de los derivados de monoacilados de 2-fenilpiperazina **66** y **67** (precursores de los compuestos **68-72**). 141

Figura 15. Síntesis de los nuevos derivados de 2-fenilpiperazina **68-72**. 145

Figura 16. Ejemplo del algoritmo empleado para la segmentación del núcleo y citoplasma para el ensayo de fluorescencia cuantitativa en células HeLa sanas (a) e infectadas con dl309 (b). Los núcleos se definieron con la tinción DAPI (azul, bordes marcados en amarillo). Los bordes citoplasmáticos se definieron por la la tinción de citoqueratina 18 en (a), y por la combinación de citoqueratina 18 y proteínas tardías del virus en (b) (verde, bordes marcados en magenta). 148

Figura 17. Purificación de la AVP de adenovirus. Se observan las muestras de los lisados de bacteria inducida con IPTG para expresar AVP (línea a), el sobrenadante del lisado centrifugado a 10000 x g (línea b), la fracción recogida de la etapa de la columna cromatográfica DEAE (línea c), la actividad de la fracción de la columna de S-Sepharosa (línea d), la AVP purificada a través de la columna de zinc-iminodiacético (línea e), y los marcadores moleculares (línea f) fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con Coomassie azul brillante. Adaptada de Mangel WF. y col., 1995. 152

Figura 18. Método de la gota sentada (a) (Adaptado de www.wikipedia.es) y proceso de formación de cristales de proteínas (b) (Adaptado de Russo Krauss I. y col., 2013). 153

Figura 19. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **46**. 160

Figura 20. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **59**. 161

Figura 21. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **60**. 162

Figura 22. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 63	163
Figura 23. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 64	164
Figura 24. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 65	165
Figura 25. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 68	166
Figura 26. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 69	167
Figura 27. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 70	168
Figura 28. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 71	169
Figura 29. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 72	170

ABREVIATURAS

¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
293	Las células embrionarias de riñón humano
Å	Angstrom
A549	Células humanas de epitelio alveolar basal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASU	Unidad asimétrica
AVP	Proteasa del adenovirus
CAR	Receptor de coxsackie-adenovirus
CC50	Concentración citotóxica 50
CDCI3	Cloroformo deuterado
CMX001	Hexadeciloxipropil-cidofovir
COSY	Espectroscopía de correlación
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
DBP	Proteína de unión a ADN
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DTT	Ditiotreitol
EM	Espectrometría de masas
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
HAdV	Adenovirus Humano
HAdVpol	Polimerasa de adenovirus
HCMV	Citomegalovirus humano
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear simple
IC50	Concentración inhibitoria 50
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

Kd	Constante de disociación
MHz	Megahercios
MOI	Multiplicidad de infección
MPD	2-Metil-2,4-pentenediol
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas
PEG	Polietilenglicol
PML	Proteína promielocítica de la leucemia
ppm	Partes por millón
pTP	Precursor de la proteína terminal
pVIc	Péptido de la región C-terminal de la proteína precursora pVI
qPCR	PCR en tiempo real cuantitativa
SAR	Relación estructura-actividad
SI	Índice de selectividad
TCID ₅₀	Dosis infectiva media en cultivo celular
TOS	Trasplante de órgano sólido
TOS	Receptor de trasplante de órgano sólido
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TPH	Receptor de trasplante de progenitor hematopoyético
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
δ	Desplazamiento químico
φ29	Bacteriófago φ29

I. ABSTRACT

In immunocompetent individuals, human adenovirus (HAdV) infections are mostly self-limiting; however, in immunocompromised patients, such as solid-organ transplant (TOS) or hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, HAdV infections are the cause of high morbidity and mortality; in fact, HAdV has the highest reported increase in incidence of any virus in transplantation recipients in recent years, especially in pediatric units. In addition, with the advances in molecular diagnosis techniques, HAdV has been increasingly found to be involved in sporadic cases and outbreaks of severe community-acquired pneumonia (CAP) in healthy adults.

Since there are no currently approved antiviral drugs to specifically treat HAdV infections, here we report the synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships of a new library of small molecules as the first step in the development of a specific drug to treat infections by HAdV. Based on the fact that piperazine derivatives had previously proved their utility as an effective source of antiviral compounds with different mechanisms of action, we synthesize by a short and high yielded methodology, three generations of new 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-methylpiperazine and 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives, comprising a total of 52 compounds.

By using the biological evaluation and structure-activity relationships, we have identified six phenylpiperazine derivatives that significantly inhibited HAdV infection. These six compounds showed the capacity to block HAdV and human cytomegalovirus (HCMV) replication at low micromolar concentration, with little or no cytotoxicity and targeting different phases of their life cycle, providing potential candidates for the development of a new family of antiviral drugs for the treatment of infections by DNA viruses.

II. INTRODUCCIÓN

1. Adenovirus

1.1. Clasificación y estructura del HAdV

El adenovirus humano (HAdV) es un virus sin envuelta, perteneciente a la familia *Adenoviridae* y género *Mastadenovirus*. Este género se divide en más de 60 tipos clasificados en siete subgrupos o especies (de la A a la G) basadas en sus características biológicas, inmunológicas y bioquímicas [1] (tabla 1). Los primeros 51 tipos fueron identificados mediante análisis de serotipo, mientras que las técnicas de secuenciación de genoma completo y análisis bioinformático han permitido la identificación de nuevas especies (HAdV-G) y tipos 52-67. En la tabla 1 se muestran así mismo las preferencias en cuanto a tropismo tisular de las diferentes familias. La especie A está relacionada principalmente con el tracto gastrointestinal [2], mientras que los subgrupos B y C son más comunes en enfermedades del aparato respiratorio [3]. HAdV-D es el mayor causante de conjuntivitis [4,5], y el HAdV-E está asociado a infecciones oculares y respiratorias, aunque en mayor medida produce conjuntivitis [6]. Finalmente, las especies F y G son agentes causantes de gastroenteritis [2,7,8]. En humanos, el HAdV-36 se ha asociado con la obesidad, y existen estudios que sugieren que los HAdV tienen un papel relevante en el desarrollo de la misma [9,10].

Especies	Tipos (serotipos/genotipos)	Tropismo
A	12, 18, 31, 61	Entérico y respiratorio
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66	Respiratorio, ocular y renal
C	1, 2, 5, 6, 57	Respiratorio, ocular, hepático y linfoide
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54, 56, 58–60, 63–67	Ocular y entérico
E	4	Respiratorio y ocular
F	40, 41	Entérico
G	52	Entérico

Tabla 1. Especies, tipos y tropismos tisulares de HAdV. Adaptada de T. Lion, 2014.

II. INTRODUCCIÓN

La estructura del HAdV, con un diámetro de entre 70 a 100 nm se compone de dos elementos principales: el núcleo o core que contiene el genoma de ADN lineal de doble cadena, y la cápsida externa. La cápsida posee simetría icosaédrica y está formada por tres componentes principales: el hexón, proteína mayoritaria y localizada en las caras y bordes de la cápsida; la base pentona, situada en los vértices; y la fibra unida a la pentona (Figura 1). La fibra es una proteína trimérica con un dominio globular en la parte distal, responsable de la unión del virus al receptor de la célula hospedadora [11]. La longitud de estas fibras varía entre los distintos tipos de HAdV, en función del número de repeticiones en la secuencia de aminoácidos del eje de la fibra, que va desde 6 repeticiones en HAdV3 hasta las 22 en HAdV2 y HAdV5 [12,13].

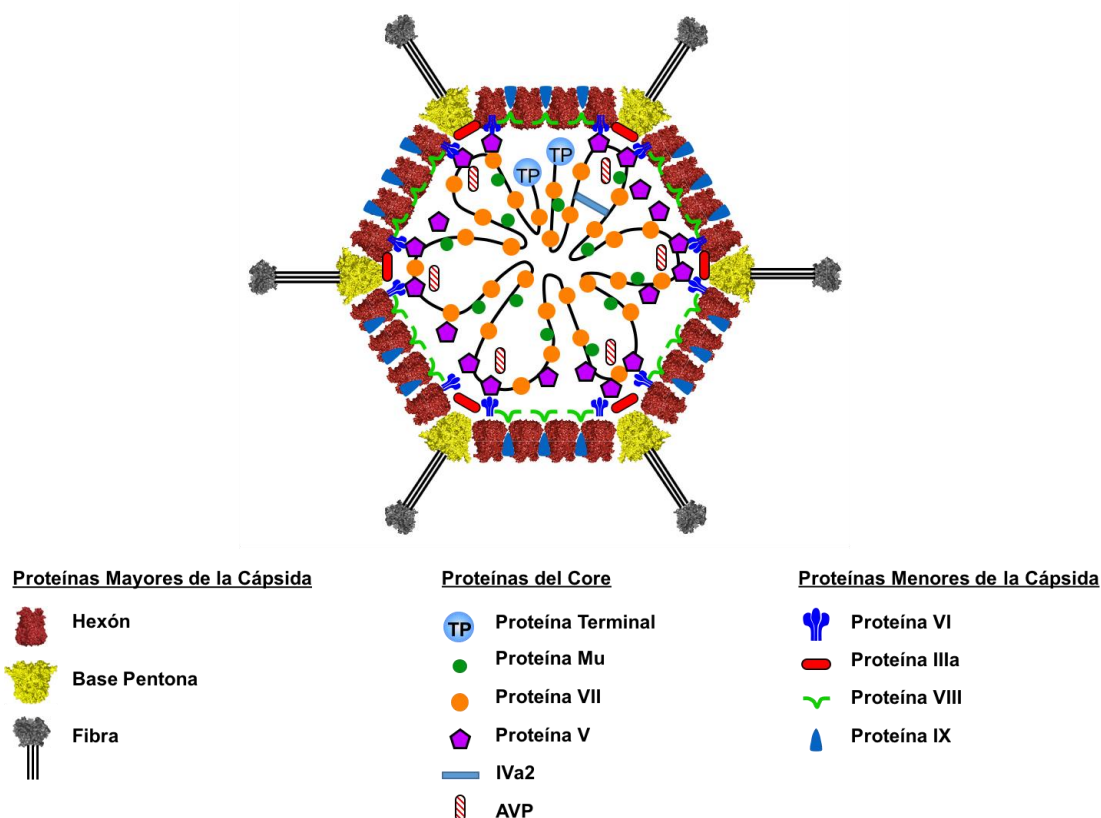


Figura 1. Estructura del Adenovirus.

Las proteínas menores de la cápsida IIIa, VI, VIII, y IX confieren estabilidad a la estructura completa del virión [14], y juegan papeles fundamentales en los procesos que ocurren tras la internalización, tales como

la penetración del endosoma, la activación transcripcional, y la reorganización nuclear (proteína IX) [15,16].

El core de la estructura del HAdV consiste en el ADN genómico de doble cadena y 6 proteínas. El genoma se encuentra condensado y asociado a las proteínas V, VII y μ [17], y con el extremo terminal unido covalentemente a dos copias de la proteína terminal (TP) [18]. La proteína VII, una proteína similar a histonas, organiza el genoma viral en estructuras similares al nucleosoma, permitiendo la condensación del ADN del HAdV [19,20]. La proteína V interviene en la unión del ADN viral con la cápsida, a través de interacciones con la proteína VII y la base pentona [20,21]. Los viriones completamente maduros contienen también la proteína IVa2, que interactúa de manera específica con el promotor mayor tardío del genoma de HAdV necesario para el empaquetamiento del ADN del virus [22,23]. Además en el núcleo se encuentra la proteasa del HAdV (AVP), esencial en el proceso de maduración de las nuevas partículas víricas [24] que se tratará con mayor detalle en el apartado 3.3. de esta sección.

1.2. Organización del genoma del HAdV

El genoma del HAdV es una molécula de ADN de doble cadena linear, con un tamaño de entre 34 a 37 kb y que porta unos 40 genes [25]. Flanqueando ambos extremos del genoma se encuentran las repeticiones terminales invertidas (ITRs) que actúan como origen de replicación junto con la secuencia de empaquetamiento (Ψ). La organización del genoma es similar en los distintos tipos de HAdV, pudiendo dividirlo en tres regiones: temprana (E1A, E1B, E2, E3, E4), intermedia (IX e IVa2) y tardía (L1-L5). Cada una de estas etapas corresponde con los distintos patrones de expresión durante el ciclo de infección del virus (Figura 2).

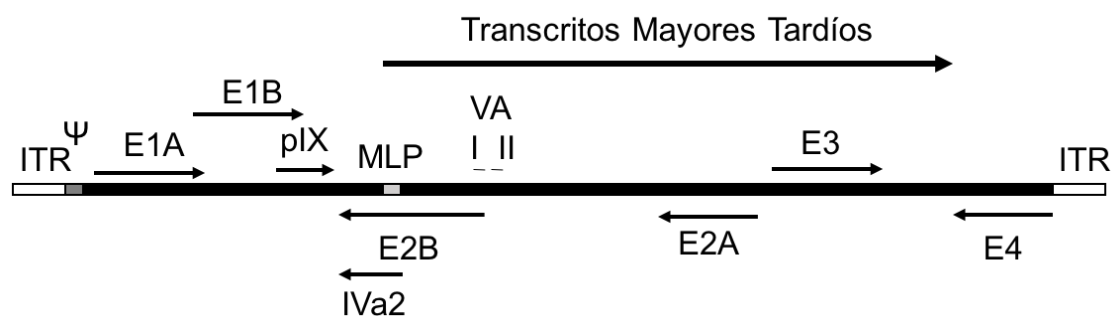


Figura 2. Esquema del genoma de HAdV5. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Adaptada de Bratati S. et al., 2014.

Las regiones E1-E4 son las primeras que se transcriben y codifican para proteínas involucradas en la replicación viral y el control de los mecanismos de la respuesta inmune del hospedador. E1A es el primer transcrito que se expresa durante la infección, y actúa como un oncogén que estimula la entrada de la célula en fase S [26,27]. El HAdV infecta células epiteliales, las cuales están terminalmente diferenciadas para no dividirse. Para que ocurra la síntesis viral, la célula debe entrar en fase S del ciclo celular (división). La entrada en esta fase ocurre mediante la interacción de E1A con la proteína del retinoblastoma [28].

E1B se expresa poco después del transcrito E1A, y codifica para las proteínas 19K y 55K, fundamentales para evitar la entrada de la célula hospedadora en apoptosis [29,30]. Las proteínas E2 median la replicación viral, mientras que las proteínas E3 y E4 interfieren tanto con la respuesta inmune como con la señalización celular del hospedador [31,32]. El gen E2 codifica tres proteínas virales que contribuyen a la replicación del genoma viral: la polimerasa de adenovirus (HAdVpol), el precursor de la proteína terminal (pTP) y la proteína de unión a ADN (DBP). Las proteínas E2 inducen por tanto la replicación viral, pero también el paso de la fase temprana a la tardía.

Los transcritos expresados en la fase intermedia incluyen a la proteína IX, que se ha demostrado que actúa como un activador transcripcional [33], y la proteína IVa2 que contribuye a la expresión de los genes tardíos [34].

La replicación del genoma viral, el ensamblaje de la cápsida y a la liberación de las cápsidas ensambladas ocurren en la fase tardía. Es importante destacar que el HAdV codifica su propia ADN polimerasa (HAdVpol) y que la replicación viral ocurre en el núcleo celular. El proceso replicativo comienza con la unión covalente de un residuo de citosina de la HAdVpol a un residuo de serina de la pTP [35,36]. Entonces, la HAdVpol emplea pTP-citosina como molde para la elongación del ADN con ayuda de la topoisomerasa 1 [37]. La DBP interviene en el proceso de elongación protegiendo la nueva cadena de ADN sintetizada mediante la capacidad que presenta para unirse al ADN monocatenario [35]. Una vez sintetizada la primera cadena de ADN, ésta se circulariza mediante la unión de secuencias complementarias ITR. Luego, la síntesis de la segunda cadena ocurre con la intervención de una nueva pTP. En la última fase, los nuevos genomas virales se asocian con las histonas celulares [38].

Tras la síntesis del ADN viral ocurre la activación del promotor mayor tardío, lo que permite la expresión de los genes tardíos (L1-L5) que codifican principalmente proteínas estructurales del virión. Además durante la fase tardía se expresan los denominados RNAs asociados a virus (VA RNA I y II), necesarios para que el virus pueda completar su ciclo lítico [39].

1.3. Ciclo de infección del HAdV

La infección de la célula hospedadora es un proceso que se inicia con la unión de la fibra de HAdV a sus receptores celulares; mayoritariamente el receptor de coxsackie-adenovirus (CAR) y el receptor CD46, y en menor medida la desmogleína 2 (DSG-2) son los receptores empleados por HAdV en la mayoría de las células [40-44]. De manera alternativa, algunos miembros pertenecientes a HAdV-D emplean el ácido siálico como receptor en lugar de CAR o CD46 y en los tipos de HAdV-2 y 5, el heparán sulfato de proteoglicanos (HSPGs) puede mediar la infección cuando la unión a los receptores CAR no es posible [15]. Tras la fase de unión, ocurre una interacción entre la base pentona del virus con las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ celulares, permitiendo la

internalización de las partículas virales a través de endocitosis mediada por clatrina [45]. Una vez dentro del endosoma, la partícula viral sufre una decapsidación parcial debida en parte a la acidificación del endosoma, causando la liberación de varias proteínas virales, entre ellas la proteína VI, cuya actividad lítica media el escape del virus al citoplasma [46,47]. Posteriormente, el virión parcialmente decapsidado es transportado mediante el sistema microtubular hasta la envoltura nuclear, donde el ADN viral junto con la proteína VII (estabilizadora del ADN) se introducen en el núcleo a través del complejo de poro nuclear [48]. (Figura 3).

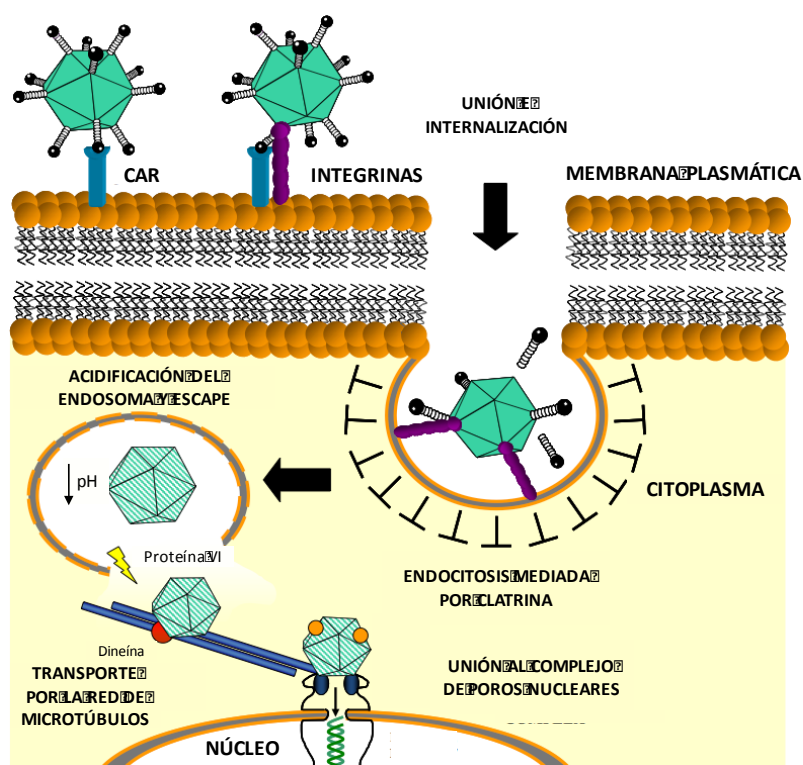


Figura 3. Representación esquemática del proceso de entrada y transporte al núcleo de HAdV5. Adaptada de Coughlan L. et al., 2010.

Una vez en el núcleo, el genoma viral se transcribe a ARNm temprano, sucede la replicación del ADN viral (comenzando entre las 6 y 8 horas postinfección), y finalmente el ARNm tardío es sintetizado. Las nuevas proteínas de la cápsida y el core que han sido sintetizadas son importadas del citosol al núcleo celular

para el ensamblaje de la nueva progenie vírica. El ciclo de vida completo ocurre entre las 24 y 36 horas y genera unos 10^4 viriones por célula infectada.

2. Impacto clínico y tratamiento de las infecciones por adenovirus

2.1. Distribución y transmisión del HAdV

Los HAdV presentan una distribución global. La mitad de los casos de infecciones por HAdV son asintomáticas, y por ello la mayoría de ellas no están documentadas, así que la información epidemiológica deriva generalmente de estudios e investigaciones de vigilancia de brotes esporádicos. Sin embargo existen estudios recientes que analizan la epidemiología de las infecciones más frecuentemente causadas por los HAdV, entre las que podemos destacar las oculares, respiratorias y gastrointestinales. Las especies B y D de HAdV, principales responsables de las infecciones oculares, generan casos de queratoconjuntivitis y conjuntivitis hemorrágica aguda que predominan en el continente asiático durante el invierno y primavera, mientras que la fiebre faringoconjuntival circula en su mayoría en China, Australia y Estados Unidos durante el verano [49]. En el caso de las infecciones respiratorias, causadas generalmente por las especies B y C de HAdV, son endémicas en la mayoría de países a nivel mundial, y suelen ocurrir en invierno, primavera y principios de verano [50]. La gran mayoría de enfermedades gastrointestinales de HAdV que están causadas por la especie F, ocurren durante todo el año, y su incidencia varía entre el 1 y el 8% en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo se encuentra entre el 2 y el 31% [51].

La transmisión del HAdV se produce fácilmente de persona a persona a través de fluidos corporales, incluyendo heces y secreciones respiratorias de las personas infectadas. El HAdV es resistente a las secreciones gástricas y biliares, por lo que puede alcanzar la mucosa intestinal y replicarse. Se trata de un virus muy resistente en el medio externo, llegando a sobrevivir hasta 3 semanas en ambientes secos [52]. Además, al tratarse de un virus sin envuelta, son resistentes a la mayoría de desinfectantes. Por ello, una correcta

desinfección en las unidades de trasplantes y cuidados intensivos es fundamental para evitar la transmisión del HAdV en pacientes inmunosuprimidos. Debido a la estabilidad que presentan estos virus y su fácil transmisión, se han descrito importantes brotes de infección en hospitales, guarderías, y entre la población militar [53-55]. El período de incubación del virus es relativamente corto, aunque puede ir de 2 días hasta 14 semanas [1].

2.2. Impacto clínico

El HAdV se ha considerado durante muchos años el agente causal de enfermedades que iban desde infecciones respiratorias y oculares agudas a enfermedades gastrointestinales más severas, pero en cualquiera de los casos nunca se le asociaba a sintomatologías clínicas graves [56]. Sin embargo, hoy sabemos que el HAdV es una de las causas más comunes de enfermedades víricas asociadas con el trasplante, presentando además una elevada morbilidad y mortalidad [1,2]. Además, el uso cada vez más generalizado de nuevas técnicas moleculares de diagnóstico han permitido identificar al HAdV como agente causal en numerosos casos aislados y brotes de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en individuos inmunocompetentes [57-59].

2.2.1. Infecciones en pacientes inmunocompetentes

Las infecciones causadas por HAdV en pacientes inmunocompetentes suelen ser autolimitadas, de carácter leve y cursar de manera asintomática, sin embargo, cada vez con más frecuencia se reportan en la literatura científica casos de infecciones respiratorias graves por HAdV, en algunos casos con resultados fatales para el paciente [60,61]. Los brotes epidémicos en individuos inmunocompetentes suelen ocurrir durante los meses de invierno y primavera, mientras que en pacientes inmunocomprometidos ocurren durante todo el año. La mayoría de las infecciones ocurren durante los primeros 5 años de vida, con un pico de incidencia a los 2 años [62,63], debido a la inmadurez de la respuesta inmune de tipo humoral.

La mayoría de infecciones respiratorias están asociadas a especies C de HAdV y en niños suponen un 15% de todas las infecciones que ocurren en el tracto respiratorio superior y el 5% en el inferior [62]. En general, estas infecciones respiratorias no revisten gravedad, sin embargo se dan casos, especialmente en individuos jóvenes donde pueden requerir el ingreso en unidades de cuidados intensivos [64], la utilización de ventilación mecánica asistida [64,65], o de soporte vital extracorpóreo [66]. También se han documentado casos de infecciones por HAdV en adultos inmunocompetentes, especialmente en el personal militar [67]. Actualmente existe una vacuna para el personal militar estadounidense en forma de tabletas que previene las enfermedades respiratorias causadas por los tipos 4 y 7 de HAdV (especies E y B respectivamente) la cual presenta una eficacia del 99,3% [68]. Por otro lado, desde hace una década y gracias al desarrollo de modernas técnicas en biología molecular, se ha detectado un aumento de los casos graves de NAC en adultos sanos causada principalmente por los tipos 3, 7, 11 y 14 de HAdV-B [57]. Los HAdV representan el 3% de las NAC, y más del 60% de los pacientes en los que se produce la enfermedad, necesitan intubación y ventilación mecánica [69]. Las tasas de mortalidad se sitúan en torno al 24% [70], pese a que en algunos casos la administración temprana de cidofovir se ha relacionado con mejorías sintomáticas de la enfermedad [71].

En niños, las infecciones gastrointestinales producidas por los tipos 40 y 41 de HAdV-F, son responsables de entre el 5-15% de las diarreas agudas [72]. Una de las infecciones más contagiosas son las queratoconjuntivitis producidas por los HAdV-D, que pueden resultar en una disminución de la capacidad visual de los pacientes afectados [73].

A pesar de la inmunidad adquirida por la mayoría de adultos frente a múltiples tipos de HAdV, existen evidencias de infecciones latentes en los sistemas linfáticos, gastrointestinal y urinario [74-76]. Estas infecciones permiten la detección de los virus en las heces y orina después de una infección aguda e incluso en casos de infecciones asintomáticas. Un requisito indispensable para el desarrollo de infecciones persistentes por HAdV es evadir al sistema inmune hospedador mediante diversos mecanismos. Entre

estos se incluye la inhibición de la apoptosis en las células infectadas, anular las respuestas al interferón y el factor de necrosis tumoral, la prevención de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, y el bloqueo de las respuestas inmunes celular y adaptativa [77-80].

2.2.2. Infecciones en pacientes inmunodeprimidos

Las enfermedades más graves producidas por HAdV son sin duda las que afectan a los pacientes inmunodeprimidos, en los cuales la infección representa una seria amenaza para la supervivencia. Las deficiencias en el sistema inmune pueden estar causadas por deficiencias manifestadas desde la infancia (inmunodeficiencias primarias o congénitas) o al empleo de medicación inmunosupresora en el caso de pacientes receptores de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) o de órgano sólido (TOS). En el caso de las inmunodeficiencias congénitas, particularmente en las inmunodeficiencias combinadas severas (SCID) son frecuentes las infecciones pulmonares graves y recurrentes causadas por HAdV, e incluso enfermedades letales diseminadas [81], con tasas de mortalidad de hasta el 55% [2].

Hoy en día, los TPH y TOS han aumentado espectacularmente debido a los avances de las terapias inmunosupresoras, esenciales para la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en receptores de TPH, así como del rechazo en TOS. Además de las dificultades relacionadas con la funcionalidad o el rechazo del órgano trasplantado, un problema importante después del trasplante es el desarrollo de infecciones virales, entre las cuales HAdV destaca como el virus que ha registrado el mayor incremento en su incidencia, sobre todo en las unidades pediátricas [2]. Diferentes estudios han puesto de manifiesto en los últimos años el creciente impacto de las infecciones por HAdV (principalmente de las familias B y C) en estos pacientes inmunocomprometidos [56,82-84]. En el caso de los TOS la enfermedad está relacionada con el tipo de trasplante. De esta manera pacientes trasplantados de pulmón, hígado, riñón o intestino delgado pueden manifestar neumonía, hepatitis, nefritis, cistitis hemorrágica, enteritis y enfermedad diseminada [85].

Los pacientes pediátricos receptores de TOS presentan una mayor incidencia y gravedad en las enfermedades producidas por HAdV que en adultos [86]. En trasplantes de hígado pediátricos, la incidencia de la infección varía del 4 al 10%, con tasas de mortalidad de un 53% [2]. Las infecciones en estos pacientes están asociadas a los serotipos 1, 2 y 5 de las especies C de HAdV. Los trasplantes renales presentan un 12% de incidencia y una tasa de mortalidad del 18% [87]. Estas infecciones están asociadas a especies B de HAdV que provocan como síntomas principales cistitis hemorrágica y nefritis [87]. En los trasplantes de corazón y pulmón se detecta al HAdV en el 7 y 50% de los pacientes pediátricos, presentando un cuadro clínico caracterizado por vasculopatía coronaria, bronquiolitis o pérdidas del injerto [88]. La tasa de infección en el caso de trasplante intestinal o multivisceral se encuentra entre el 4 y 57% y en estos pacientes es frecuente encontrar casos de enfermedad diseminada por HAdV [1,89].

Las infecciones por HAdV son frecuentes y están bien caracterizadas en el receptor de TPH. Se manifiestan con un espectro clínico variado incluyendo neumonía, colitis, hepatitis, cistitis hemorrágica, nefritis túbulo-intersticial y encefalitis, pudiendo causar enfermedad diseminada con frecuencia fatal. La enfermedad diseminada por HAdV se observa en 10-20% de los casos, con tasas de mortalidad asociadas superiores al 50% [85]. La infección por HAdV puede ocurrir en cualquier momento después del trasplante, aunque numerosos estudios señalan una mayor incidencia durante los 100 primeros días después del TPH en adultos, mientras que suele ser más precoz (<30 días) en pacientes pediátricos [1,85,90]. En pacientes pediátricos receptores de TPH alogénico se registran tasas de infección del 3-47% y mortalidades superiores al 50% que dependen de diversos factores como la edad, el régimen de condicionamiento, el método diagnóstico y la naturaleza del estudio realizado (prospectivo o retrospectivo) [85,91,92]. Las tasas de infección en adultos suelen ser inferiores, del 3% al 15% [1,92]. Tanto en pacientes adultos como pediátricos receptores de TPH alogénico, un aumento de la carga viral de HAdV en sangre periférica (determinada mediante PCR cuantitativa), y a pesar del tratamiento antiviral, se asocia a tasas de mortalidad cercanas al 100% [93].

3. Perspectivas en el descubrimiento y desarrollo de antivirales

3.1. Artículo I. Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies



Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies

Pablo Martínez-Aguado, Ana Serna-Gallego, José A. Marrugal-Lorenzo, Isabel Gómez-Marín and Javier Sánchez-Céspedes

Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology, and Preventive Medicine, Seville, Spain

Human adenoviruses (HAdV) are the cause of many acute infections, mostly in the respiratory and gastrointestinal (GI) tracts, as well as conjunctivitis. HAdV diseases in immunocompetent individuals are mostly self-limiting; however, in immunocompromised individuals, especially in pediatric units, HAdV infections are the cause of high morbidity and mortality. Despite the significant clinical impact, there are currently no approved antiviral therapies for HAdV infections. Here, we provide an overview of the different targets that could be considered for the design of specific drugs against HAdV, as well as the available *in vitro* and *in vivo* tools for the screening and evaluation of candidate molecules.

Introduction

HAdV are common pathogens that affect the respiratory, GI, ocular and excretory systems. In immunocompetent individuals, HAdV infections are mostly self-limiting; however, in immunocompromised patients, such as solid-organ transplant (TOS) or hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, HAdV infections are the cause of high morbidity and mortality [1]; in fact, HAdV has the highest reported increase in incidence of any virus in transplantation recipients, especially in pediatric units [2].

Despite the significant clinical impact, there are currently no approved antiviral therapies for HAdV infections. Suboptimal therapeutic options to treat HAdV infections in immunocompromised patients include the use of broadly acting antivirals, such as ganciclovir (GCV), ribavirin, and cidofovir, in all cases showing variable results [3]. Ribavirin and cidofovir are the most frequently used, although neither has been approved for specific use in HAdV infections. The compound CMX001 (brincidofovir), a lipidic conjugate of cidofovir, has shown to be effective in eradicating disseminated HAdV infection in animal models and has demonstrated to be safe; however, data are scarce relating to its clinical effectiveness in a disseminated HAdV infection setting [4]. In

this situation, other potential antiviral agents with increased therapeutic activity are still needed.

Here, we provide an overview of the known cellular and viral targets of HAdV, as well as the available analytical tools for the screening and evaluation of candidate molecules, which are essential steps in the process of designing effective antiHAdV drugs.

Current treatment approaches

The treatment of HAdV infection is only recommended in immunocompromised patients, especially patients undergoing allo-HSCT, who have the highest risk of severe infection [5].

Antiviral drugs

Among the commercially available antiHAdV drugs, only GCV, ribavirin, and cidofovir (Fig. 1) have shown *in vitro* efficacy against different HAdV serotypes [6,7]. Cidofovir (Fig. 1) is a nucleotide analog of cytosine that inhibits viral DNA replication by more efficient competitive incorporation into DNA [8]. Cidofovir displays efficacy against several DNA viruses, but is only regulatory approved for the treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS [8,9]. Cidofovir exhibits antiviral activity against all HAdV species, but has low oral bioavailability and significant toxicity (tubular necrosis), and does not confer long-term protection [10,11]. In addition, in 2014, Gilead Sciences, the

Corresponding author: Sánchez-Céspedes, J. (jsanchez-ibis@us.es)

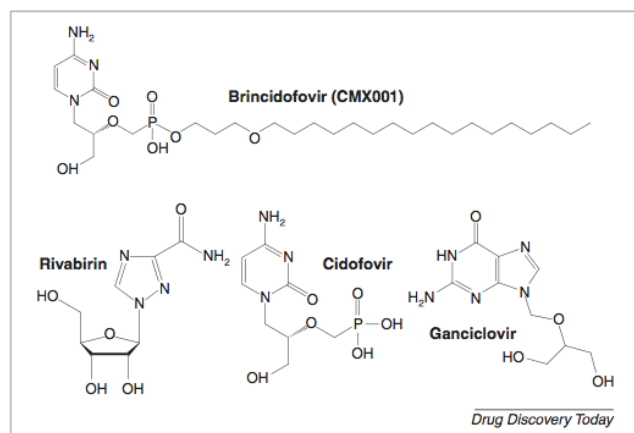


FIGURE 1

Chemical structure of antiviral drugs with reported anti-human adenovirus (HAdV) activity.

manufacturer of cidofovir (Vistide[®]), formally requested the cancellation of the authorization for marketing cidofovir in Europe, claiming problems with its production and the availability of alternative therapies for indications for which it was approved (cytomegalovirus retinitis) [12]. Currently, and even with its low bioavailability and nephrotoxicity, cidofovir is the antiHAdV drug of choice for preemptive therapy [2,13]. The reported clinical efficacy of cidofovir in the allo-HSCT setting is highly variable, with some studies reporting low or total lack of efficacy and others showing success rates higher than 70% [13–17].

Brincidofovir (CMX001) (Fig. 1), an orally bioavailable lipid conjugate of cidofovir, uses cellular plasma membrane proteins (flippases) for rapid entry into cells, which results in higher intracellular concentrations [18]. It has proven to be effective in eradicating disseminated HAdV infection when tested in the Syrian Hamster model, which is permissive for HAdV5 replication, and to be safe in healthy volunteers [19,20]. At present, a phase III multicenter study of brincidofovir is recruiting participants to study its efficacy in the treatment of HAdV (NCT02087306).

Ribavirin is a broad-spectrum antiviral agent that shows *in vitro* activity against DNA and RNA viruses (Fig. 1). It is a nucleoside analog of guanosine, but its mechanism of action is unclear and still controversial, with different mechanisms proposed to explain its activity [7,21]. Ribavirin has variable activity against different HAdV types, displaying maximum activity against subgroup C, although the plasma concentrations reached by ribavirin are 10 times below the required IC₅₀ value [6,22].

GCV is another nucleoside analog (Fig. 1) that has been used for the treatment of HAdV infections, with variable results [23–25]. GCV triphosphate is an effective inhibitor of the HAdV DNA polymerase *in vitro* [3,7]. However, because HAdV lacks viral thymidine kinase, and cellular kinases are inefficient at phosphorylating GCV, its antiHAdV activity is poor. Retrospective studies have shown a lower incidence of HAdV infection in patients receiving GCV as cytomegalovirus (CMV) prophylaxis [26]. However, GCV did not show a significant reduction of infection when used to treat HAdV infections and, in addition, induced neutropenia, which is especially critical in patients receiving HSCT [26,27]. Based on these data, there is no justification to use this

drug for HAdV treatment; however, a recent report demonstrated that GCV was effective treating HAdV infection in a Syrian Hamster model, putting GCV back in the optional repertoire of anti-HAdV drugs [28]. Moreover, a valyl-ester prodrug of GCV, valganciclovir (VGCV), has shown significant antiHAdV activity in the same animal model of infection [29]. The Syrian hamster is permissive for HAdV replication in organs and tissues and the infection causes a pathology similar to that observed in humans [19]. In this model, Syrian hamsters are immunosuppressed with cyclophosphamide, which increase virus replication in various organs (mainly in the liver) and the HAdV pathology. The success of CMX001 in treating HAdV infections in humans, which was previously reported using this model of infection, lends support to the idea that results obtained using this model could be extrapolated with a high level of confidence to humans [30].

Immunotherapy

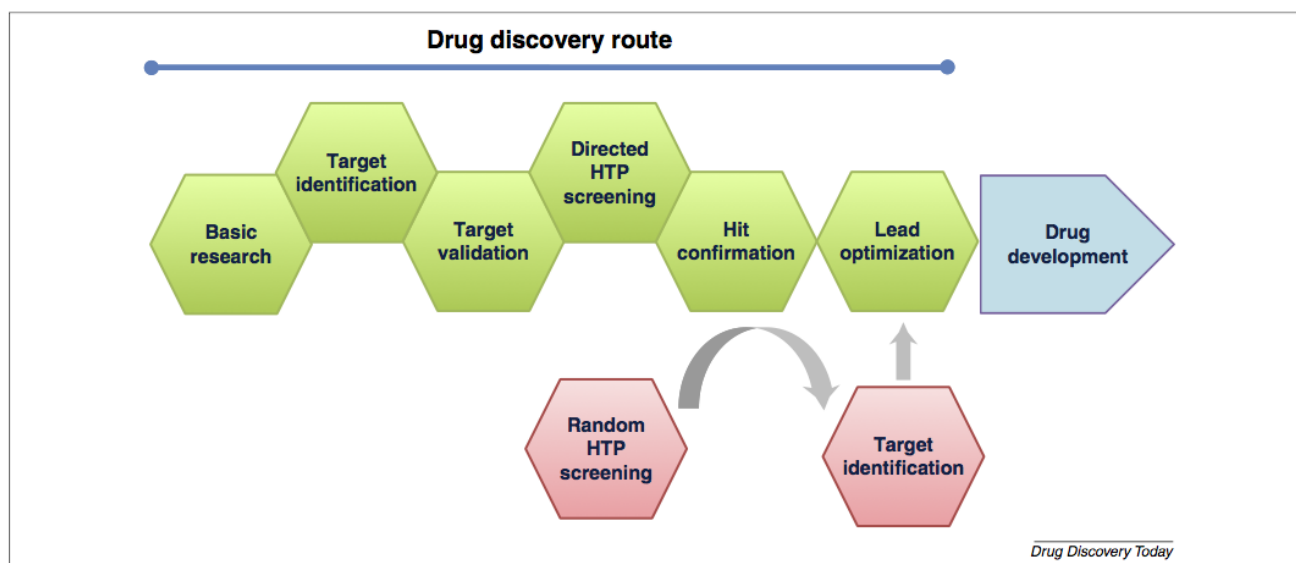
Immunosuppressive regimens, essential for the survival of the allograft in the transplant setting, cause a global suppression of the adaptive immunity in transplant recipients, limiting the ability to control viral replication. The use of lymphocyte infusions is based on the premise that peripheral blood from donors has T cells with antiviral activity [14]. Several studies have reported the efficacy of donor lymphocyte infusions in patients receiving HSCT who did not respond to antivirals [23,31]. In addition to the lymphocyte infusion, adoptive T cell therapy might be one of the most significant advances for treating viral infections in patients receiving HSCT [32].

Characterization of HAdV-specific T cell responses in healthy and infected patients has shown an increase in CD8+ and CD4+ T cells against a repertoire of viral epitopes [33–36]. The use of specific memory T cells has also been shown to be safe and effective for treating HAdV infections, especially in pediatric and adult patients receiving HSCT [33,36–39]. Haveman *et al.* demonstrated that CD4+ T cells are crucial for controlling HAdV infection, and developed a method to expand and isolate functional HAdV-specific CD4+ T cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) that were not alloreactive and killed HAdV-infected cells effectively [40].

Immunotherapy with donor-derived adenovirus-specific T cells is a promising approach for the treatment of HAdV and other viral infections. Different systems that rapidly generate preparations of antigen-specific polyclonal (CD4+ and CD8+) cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from several viruses have already been described for viruses that cause post-transplant morbidity and mortality, including HAdV, CMV, and BK virus [36,41–45]. The method for producing CTLs for adoptive immunotherapy is currently being tested with encouraging results; however, it is still a complex, time-consuming, and expensive procedure. Thus, the broad use of these treatments might require the development of new, faster, and inexpensive manufacturing procedures, allowing the availability of specific CTL banks for the extended use of these therapies in nonspecialized centers [46,47].

Screening and evaluation methodologies for drug discovery

The drug-discovery process is divided into several phases and, generally, each phase must be completed before proceeding to

**FIGURE 2**

Successfully translate basic research into an approved antiviral drug is a costly, lengthy, complex, challenging, and highly regulated process. *Abbreviation:* HTP screening, high-throughput screening.

the next one (Fig. 2). The design of novel and potent antiAdV agents requires first the availability of *in vitro* and *in vivo* models for the evaluation of the candidate molecules (Table 1). Fortunately, the study of basic aspects of HAdV biology as a tool for studying how eukaryotic cells work has enabled us to increase our knowledge about its replicative cycle and mechanisms of infection. This has led to the development of multiple laboratory techniques for the study of every step of the HAdV replicative cycle. This knowledge makes the use of different approaches to evaluate potential antiHAdV drugs relatively easy.

In vitro susceptibility assays

The availability of a cell culture model for a given virus for the evaluation of the antiviral activity of a candidate molecule is essential for the implementation of a high-throughput screening (HTS) methodology. When screening for compounds that directly affect the function of a target protein, biochemical or target-based assays are used, whereas cell-based phenotypic assays are used when evaluating the antiviral activity of compounds in whole cells. An example of a target-based assay is that applied by McGrath *et al.* to study the antiviral activity of a set of compounds

TABLE 1

In vivo infection models for the study of antiHAdV drugs

Virus and/or strain	Host	Host immune status	Route of infection	DNA detected in tissue	Viral antigens in organs	Antibodies in serum	Refs
HAdV-1, -2, -5 and -6	Rabbit	Wild type	Corneal	Not reported	Not reported	Yes	[95,96]
HAdV-5	Mouse (C57BL/6N, C57BL/10ScN, CBA/N, and C3H/N)	Wild type	Intranasal	Not reported	Lungs	Not reported	[93]
	Mouse (CBA/CaJ, BALB/c)	Wild type	Intravenous	Liver	Liver	Yes	[55,94]
	Pig	Wild type	Intravenous	Liver, lung, kidneys, and blood	Not reported	Not reported	[55]
	Rat	Wild type	Intranasal	Not reported	Lungs	Not reported	[59]
	Syrian hamster	Wild type	Intranasal and/or endotracheal	Liver and lungs	Liver, lungs	Yes	[97,98]
			Intravenous	Liver, lung, adrenal gland, heart, and kidney	Not reported	Yes	[99]
		Immunocompromised (cyclophosphamide)	Intravenous	Fatal disseminated adenovirus	Not reported	No	[20]
Murine adenovirus/MAV-1	Mouse (BALB/c SCID)	Prkdc ^{scid}	Intranasal	Liver, heart, kidney, spleen, intestine, and lungs	Multiorganic	Not reported	[54]

in an enzymatic assay using purified HAdV-2 proteinase [48]. The most common cell-based *in vitro* antiviral assays for HAdV are the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-based method, the plaque assay, real-time PCR, and the yield reduction assay, which screen for inhibitors of HAdV infection at any step of the replicative cycle (Table 1) [11,49,50]. Other methods use HAdV nonreplicative vectors containing a reporter gene to screen for compounds that block HAdV entry, as well as transcription, translation, and stability of the transgene [11]. Also, several other cell-based assays have been developed to evaluate the antiviral activity of compounds at specific steps of the HAdV life cycle. Among them are attachment or binding assays, either using labeled antibodies or radiolabeled markers, internalization assays or assays to measure virus penetration into the cytoplasm, both directly or indirectly as the α -sarcin assay, to evaluate the ability of the compound to inhibit HAdV escape from the endosome [11,51–55]. Other available methodologies for cell-based screening assays include the use of label-free detection methods, the use of HAdV vectors with a fluorescent fusion protein (GFP-pV) and a full-length genome, or the application of live-cell fluorescence microscopy together with a replication-competent HAdV2 expressing GFP to evaluate viral infection, cell proliferation, or cytotoxicity [56–58].

The use of HAdV or cell lines constructed to express a reporter gene are the most recommended for screening large libraries of compounds (C.A. Zapka, PhD thesis, Youngstown State University, 2007) [11]. Results obtained with the screening of these large libraries are useful for the implementation of ligand-based approaches, such as structure–activity relation (SAR) analysis. A SAR analysis determines the chemical space surrounding a compound to find structural analogs with enhanced activity. The SAR analysis optimizes the number of hits to a reduced group of compounds with improved activity (lead compounds). Quantitative SARs (QSARs) are a mathematical model that relates a quantitative measure of chemical structure to a biological effect, and such approaches are particularly useful in lead structure development and optimization [59].

In vivo models

A key issue for identifying new and more potent drugs that specifically target HAdV is the availability of a suitable animal model that mimics systemic HAdV infectious diseases (Table 1). HAdV replication is generally species specific, and HAdV replicates poorly in cells from most other species. Most data on the efficacy of antiviral compounds against HAdV come from tissue culture experiments, individual case reports, or small-scale prospective clinical studies. In contrast to other species studied, the Syrian hamster is permissive for species C HAdV replication. HAdV5 causes severe systemic disease in the immunosuppressed Syrian hamster that is similar to that observed in immunocompromised patients, with high replication rates in organs, blood, and tissue, and organ damage [19,60,61]. Several other experimental models (Table 1) have been used to study antiviral therapies against HAdV infection, including mice [62], pigs [63], dogs [64], New Zealand rabbit [65], or cotton rat, a semi-permissive model for HAdV infection that has been used as a model for oncolytic vectors and pneumonia [30,66,67].

Viral targets for drug discovery

Ideally, the targets for the design of antiviral agents must be proteins whose function is essential to complete the viral replicative cycle. In the case of HAdV, the proteins studied as potential antiviral targets are usually limited to the entry, replication, and maturation steps (Fig. 3).

Adenovirus entry

HAdV cell entry (Fig. 3) begins with the attachment of the HAdV fiber to its cellular receptors; coxsackievirus and HAdV receptor (CAR), CD46, or desmoglein 2 (DSG-2) are the primary attachment receptors for HAdV in most cell types [68–73]. Alternatively, members belonging to HAdV-D have been reported to use sialic acid as a receptor rather than CAR or CD46 and heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) have been shown to mediate HAdV types 2 and 5 (HAdV-C) infection when CAR binding is invalidated [73]. After the attachment step, the association of the HAdV penton base with cellular $\alpha\beta$ -integrins triggers the internalization of the HAdV viral particles via clathrin-mediated endocytosis [74].

Epigallocatechin gallate (EGCG), a green tea catechin, was recently shown to be able to block HAdV attachment to the host receptors at low micromolar concentration [75]. This small molecule competes with heparan sulfate and sialic acid for binding many unrelated enveloped and nonenveloped viruses. Given that HSPGs have a role as coreceptors for HAdV-C entry and sialic acids

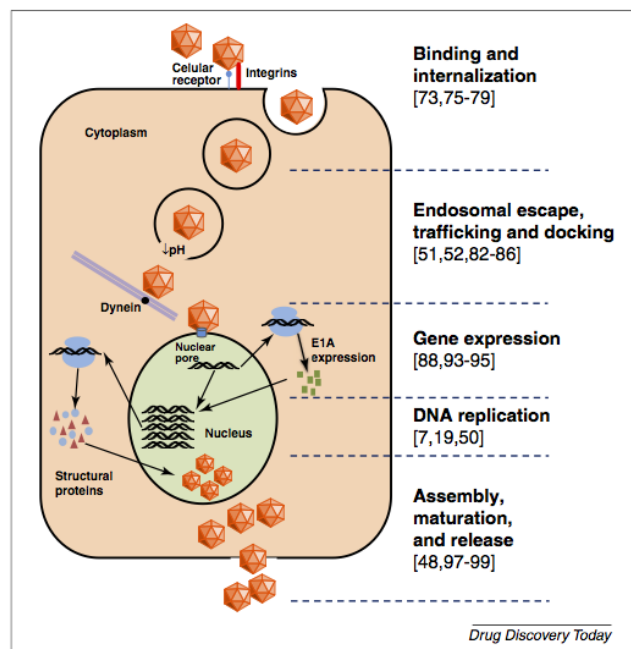


FIGURE 3

The replicative cycle of human adenovirus (HAdV) is a highly coordinated multistage process and any of these steps could be used as a target for the design of new antiHAdV agents. For references relevant to binding and internalization, see [73,75–79], for endosomal escape, trafficking, and docking, see [51,52,82–86], for gene expression, see [88,93–95], for DNA replication, see [7,19,50], and for assembly, maturation, and release, see [48,97–99].

are used by HAdV-D as cellular receptors, EGCG could be used as inhibitor of HAdV-C and -D infection by competing with cellular HSPGs and sialic acids for HAdV binding, although this hypothesis needs to be confirmed [75,76]. Another approach that has been assayed to block HAdV entry was the use of a synthetic Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP) peptide, the $\alpha 5 \beta 1$ -integrin receptor ligand [77]. Its antiHAdV effect along with its low cytotoxicity must encourage us to evaluate the activity of this peptide for potential local or systemic administration to treat HAdV infections. Lactoferrin, a multifunctional glycoprotein, has been shown to inhibit HAdV2 infection by interacting with the HAdV penton base, preventing viral adsorption and internalization into the cells [78]. Lactoferrin was shown to interact directly with the viral particles because preincubation of cells with lactoferrin generated an inhibition of viral infection of approximately 60%, whereas this inhibition reached 95% when lactoferrin and HAdV2 were pre-incubated for 1 hour and then added to the cells [78]. Synthetic peptidomimetics of the arginine-glycine-aspartic (RGD) motifs, present in the HAdV penton base and essential for virus internalization, have also been found to act as HAdV entry inhibitors and have been suggested as antiviral agents in the treatment of HAdV infections [79].

Further on in the entry process of HAdV, endosomal membrane penetration (Fig. 3) has been shown to be another excellent candidate as a target for new antiHAdV drugs [51]. The acidification of the endosome provokes the partial disassembly of the viral capsid and the subsequent release of protein VI, whose lytic activity mediates the escape to the cytoplasm [54,80]. Smith *et al.* described the antiHAdV activity of α -defensins, natural occurring antimicrobial peptides with a wide spectrum of antimicrobial activities. They found that the α -defensins human neutrophil peptide 1 (HNP1) and human defensin 5 (HD5) showed antiHAdV activity at low micromolar concentrations, targeting the virus disassembly at the vertex region and so the release of protein VI and the subsequent membrane penetration [51]. Finally, the partially uncoated capsid is transported along the microtubule network to the nuclear membrane, where the viral genome is delivered into the nucleus [81]. Inhibition at later steps in the HAdV entry pathway, after endosomal escape, has been less characterized. One of those steps is microtubule transport (Fig. 3) to the microtubule-organizing center [82,83]. Myers *et al.* suggested that neutralizing antibody 9C12 binding altered the association between HAdV capsid and microtubules, showing that a mutation (G434D) in the hexon precluded 9C12 binding [82]. Previous to 9C12, two different inhibitors of HAdV infection were described, leptomycin B and ratjadone. These molecules blocked access of the viral DNA to the nucleus, promoting HAdV accumulation at the microtubule-organizing center (MTOC) by inhibiting the activity of the nuclear export factor chromosomal maintenance 1 (CRM1) [83–85]. Another mechanism for virus neutralization requires binding of antibodies previously attached to viral particles to the cytosolic antibody receptor tripartite motif containing 21 (TRIM21). This approach involves virus degradation before DNA delivery into the nucleus [86].

Adenovirus DNA replication

Once HAdV particles are docked at the nuclear-pore complex, the HAdV genome, together with protein VII, is imported into the

nucleus [53]. Before HAdV DNA replication, the transcription of adenovirus early region 1A (E1A) by cellular RNA polymerase II occurs from the E1A promoter [87–90]. The E1A protein has an important role in the regulation of host gene expression and is also necessary for the expression of the early genes *E1B*, *E2*, *E3* and *E4* from different promoters as well as for HAdV DNA replication [89,91,92]. Moreover, for HAdV DNA replication to occur requires three essential proteins: the viral DNA polymerase, the preterminal protein (pTP), and the DNA-binding protein, all of which are potential targets for new antiHAdV drugs [88]. Among the different potential targets of HAdV, the DNA replication process (Fig. 3) has been the most explored, and several molecules other than cidofovir have been described [7,19,50]. One of the keys for the selection of new nucleoside analogs for the design of antiHAdV drugs is their ability to discriminate between the HAdV DNA polymerase and cellular DNA polymerases.

In recent years, another approach to inhibit HAdV DNA replication has emerged by using short interfering RNAs (siRNAs) [93,94]. Several siRNAs targeting different transcripts have been evaluated for their potential antiHAdV activity. Among them, those directed against DNA polymerase, pTP, IVa2, or E1A transcripts have shown the best results, efficiently silencing the respective genes, probably because of the lower amounts of mRNAs transcribed compared with those generated by the strong major late promoters (MLP) of hexon or protease genes [88]. Moreover, given the presence in higher amounts of virus-associated RNAs (VA-RNAs), which seem to counteract RNA interference (RNAi) during late-stage gene expression, the inhibition of HAdV DNA replication might be more beneficial because it would decrease HAdV genome copy numbers and so the copy number of VA-RNA genes [88,95]. In this regard, Kneidinger *et al.* proposed that silencing of the *E1A* gene, which promotes DNA replication, even when present at low concentrations, could be a potential drug target [88].

Adenovirus maturation

The HAdV proteinase or cysteine protease adenain (AVP) is another essential enzyme for the generation of new HAdV infective particles and is involved in their maturation (Fig. 3) [96,97]. AVP is initially synthesized in an inactive form and the penultimate step, before the appearance of infectious virus, is its activation by two cofactors, pVIc, the 11-amino acid peptide from the C terminus of the precursor to protein VI (pVI), and the viral DNA genome, followed by the processing of the virion precursor proteins [48].

Comparison of the structures of the inactive AVP structure and the active AVP–pVIc complex structure revealed several differences that could be targets for drug interactions [48]. An example that confirms these data is the inhibition of the AVP and AVP–pVIc complexes by compound NSC 37249, belonging to a first generation of AVP inhibitors, which showed inhibition with a K_i of 0.40 mM for AVP–pVIc complexes and a K_i of 0.15 for AVP [48]. Recently, a new generation of AVP inhibitors with optimization of their activity has been described [98,99]. Researchers initially developed a tetrapeptide nitrile 1 and a pyrimidine nitrile 2 as potent AVP inhibitors. Subsequently and guided by the high-resolution X-ray cocrystal structures of adenain with the

inhibitors, the inhibition activity of these molecules was further optimized, resulting in highly potent inhibitors at picomolar concentrations [98,99].

Host targets for drug discovery

Most of the present antiviral therapies are directed to viral targets, which limits their potential broad spectrum as well as conferring a greater risk of developing resistance. Taking into account that viral proteins interact with cellular factors to complete the viral replication cycle, different systems, such as yeast two-hybrid libraries, siRNA, or short hairpin RNA (shRNA) screens, among others, are being used to identify virus–host interactions and so potential cellular targets for antiviral therapy.

The use of niclosamide, an US Food and Drug Administration (FDA)-approved antihelminthic compound, has showed antiviral activity against a broad range of pH-dependent viruses [100]. The use of this proton carrier blocked the entry of a panel of different enteroviruses at low micromolar concentrations, by targeting endosomal acidification [100]. It has been demonstrated that infection with HAdV species C and B is pH independent; however, the use of niclosamide against enhanced GFP (EGFP)-reporter HAdV reduced the infection by 20% [54,101]. There are no data concerning HAdV susceptibility to this molecule, but it would be worthwhile to study its antiHAdV activity. Although its cytotoxicity when administered systemically is a concern, modifications in its structure could be useful to reduce this toxicity and to generate an alternative for the treatment of a range of infections.

By contrast, the ability of viruses to induce toll-like receptors (TLR) signaling pathways has emerged as a new source of therapeutics, targeting TLRs as antiviral therapies [102]. TLRs and other extrinsic innate immune modulators impair HAdV infection by different mechanisms, involving signaling to trigger an antiviral state [103]. TLR2, TLR4, and TLR9 have been described so far to detect HAdV infections by HAdV B and C and to elicit the production of proinflammatory cytokines [104–106]. An example is eritoran, an antagonist of TLR4, which has been evaluated in mouse and cotton rat models for the control of sepsis, showing encouraging results in managing the inflammation associated with influenza [107]. The use of antagonists or agonists of these TLR pathways suggests a new strategy to control viral infections, although the potential therapeutic effect of these TLR targets must be assessed first to evaluate their safety.

The chromatin-associated factor survival-time associated PHD protein in ovarian cancer 1 (SPOC1) has an important role in the DNA damage response, colocalizing with HAdV replication centers in the cell nucleus. Its role in HAdV infection is the blockage of HAdV gene expression, which the virus avoids by E1B-55K/E4orf6-dependent degradation of SPOC1 [108]. Schreiner *et al.* demonstrated that overexpression of SPOC1 generated a potent inhibition of HAdV replication, turning this factor into a potential host target to treat HAdV infection and other infections caused by DNA and RNA viruses [108]. More recently, a new potential antiviral host target was described at the promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) [109]. These PML-NBs are part of an interferon (IFN)-induced antiviral defense; however, it has been demonstrated that some of the associated proteins of these bodies (Sp100-B, -C and -HMG) are captured by the virus

and kept at the viral replication center, making them essential for HAdV to carry out its replication cycle [109]. Along similar lines, the replication processes of other DNA viruses, such as human CMV (HCMV) or herpesvirus saimiri (HVS), have been previously reported to be modulated by Sp100, because silencing of Sp100 by RNAi increased HCMV replication and gene expression [110,111].

Another example of a possible host target is the development of inhibitors of the cyclin-dependent kinases (CDK). CDKs constitute a family of serine/threonine kinases that are involved in the regulation of multiple cellular processes and, as previously reported, have important roles promoting virus replication and transcription [112]. CDK1, CDK2, CDK7, and CDK9 have been shown to activate and promote replication and transcription in different DNA viruses, including HAdV. An example of an inhibitor that suppress the replication of HAdV is FIT-039 (N-[5-fluoro-2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinithioamide), obtained from the screening of a synthetic chemical library of small molecules looking for compounds that suppressed the activity of CDK9 [113]. This molecule had an IC₅₀ value of 5.8 mM against the kinase activity of CDK9/cyclin T1 *in vitro* and also demonstrated potent replication inhibitory activity of a broad spectrum of DNA viruses by the blockage of mRNA transcription [113].

In summary, deeper knowledge of virus–host interactions at the different levels of their replicative cycle is likely to provide new broad-spectrum therapeutic targets to fight viral infections.

Concluding remarks

HAdV is currently an important pathogen with a high clinical impact in the immunocompromised population; however, no vaccines or specific antiviral drugs are currently available to treat such an infection. As for the development of specific antiHAdV drugs, we must take into account that serotyping for HAdV is not routinely performed in diagnostic units and that different HAdV serotypes can be the causative agent for the same pathology. In this regard, potential antiAdV drugs must include antivirals with a broad serotype-spectrum to HAdV; to this end, there are multiple specific HAdV processes or drug targets, such as entry, DNA replication, or virion assembly, which could direct the development of antiviral drugs. Here, we have reviewed the therapeutic alternatives available in the clinic at the present and prospects for the development of specific antiviral agents to treat HAdV infections in the immunocompromised patient. Given these opportunities and alternatives, it is difficult to understand why it is taking so long to develop a specific and effective antiHAdV drug, because it seems that all the necessary tools for drug development and data relating to virus weaknesses are available. The utility of HAdV as therapeutic vector is helping researchers to determine the many virus–host cell interactions involved in these infections, and this will be invaluable for finding a way to manage HAdV infections and reduce their impact on morbidity in immunosuppressed populations.

Acknowledgements

Supported by Plan Nacional de I+D+i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish

Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), cofinanced by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF and by the Andalusia Health and Social Welfare Ministry (PI-0058-2012). P.M.A. is supported by a

predoctoral contract PIF from the University of Seville and A.S.G. is supported by a grant from Fundación Andalusia para la Gestión de la Investigación en Salud de Sevilla (FISEVI).

References

- 1 Razonable, R.R. and Eid, A.J. (2009) Viral infections in transplant recipients. *Minerva Med.* 100, 479–501
- 2 Matthes-Martin, S. *et al.* (2012) European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl. Infect. Dis.* 14, 555–563
- 3 Lenaerts, L. *et al.* (2008) Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 18, 357–374
- 4 Matthes-Martin, S. *et al.* (2013) Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 11, 1017–1028
- 5 Lion, T. (2014) Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 441–462
- 6 Morfin, F. *et al.* (2005) *In vitro* susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antiviral Ther.* 10, 225–229
- 7 Naesens, L. *et al.* (2005) Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1010–1016
- 8 Lenaerts, L. and Naesens, L. (2006) Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* 71, 172–180
- 9 Safrin, S. *et al.* (1999) Cidofovir. Review of current and potential clinical uses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 458, 111–120
- 10 Lujan-Zilbermann, J. (2008) Infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. In *Principles & Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Long, S.S., Pickering, L.K., Prober, C.G., eds), pp. 562–566, Churchill Livingstone
- 11 Sanchez-Céspedes, J. *et al.* (2014) Inhibition of adenovirus replication by a trisubstituted piperazin-2-one derivative. *Antiviral Res.* 108, 65–73
- 12 Marketing authorisation for Vistide withdrawn. *Pharm. J.* 293
- 13 Lion, T. *et al.* (2010) Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 24, 706–714
- 14 Lindemans, C.A. *et al.* (2010) How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 116, 5476–5485
- 15 Yusuf, U. *et al.* (2006) Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 81, 1398–1404
- 16 Symeonidis, N. *et al.* (2007) Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 108–113
- 17 Bhadri, V.A. *et al.* (2009) Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients. *Transpl. Infect. Dis.* 11, 373–379
- 18 Hostetler, K.Y. (2009) Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral Res.* 82, A84–A98
- 19 Toth, K. *et al.* (2008) Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7293–7297
- 20 Painter, W. *et al.* (2012) First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2726–2734
- 21 Graci, J.D. and Cameron, C.E. (2006) Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* 16, 37–48
- 22 Morfin, F. *et al.* (2009) Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antivir. Ther.* 14, 55–61
- 23 Bordignon, P. *et al.* (2001) Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1290–1297
- 24 Chen, F.E. *et al.* (1997) Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 20, 997–999
- 25 Kurosaki, K. *et al.* (2004) Therapeutic basis of vidarabine on adenovirus-induced haemorrhagic cystitis. *Antiviral Chem. Chemother.* 15, 281–285
- 26 Bruno, B. *et al.* (2003) Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9, 341–352
- 27 Vij, R. *et al.* (2003) Low-dose short-course intravenous ganciclovir as pre-emptive therapy for CMV viremia post allo-PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 32, 703–707
- 28 Ying, B. *et al.* (2014) Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7171–7181
- 29 Toth, K. *et al.* (2015) Valganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathology in permissive immunosuppressed female and male Syrian hamsters. *Viruses* 7, 1409–1428
- 30 Wold, W.S. and Toth, K. (2012) Syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds. *Adv. Cancer Res.* 115, 69–92
- 31 Chakrabarti, S. *et al.* (2002) Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100, 1619–1627
- 32 Moss, P. and Rickinson, A. (2005) Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 9–20
- 33 Leen, A.M. *et al.* (2008) Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J. Virol.* 82, 546–554
- 34 Sylwester, A.W. *et al.* (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 202, 673–685
- 35 Hislop, A.D. *et al.* (2002) Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein–Barr virus infection. *J. Exp. Med.* 195, 893–905
- 36 Gerdemann, U. *et al.* (2009) Nucleofection of DCs to generate multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol. Ther.* 17, 1616–1625
- 37 Hanley, P.J. *et al.* (2011) Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein–Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy* 13, 976–986
- 38 Zandvliet, M.L. *et al.* (2010) Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica* 95, 1943–1951
- 39 Feuchtinger, T. *et al.* (2006) Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 134, 64–76
- 40 Haveman, L.M. *et al.* (2013) Selection of perforin expressing CD4+ adenovirus-specific T-cells with artificial antigen presenting cells. *Clin. Immunol.* 146, 228–239
- 41 Gerdemann, U. *et al.* (2012) Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol. Ther.* 20, 1622–1632
- 42 Gerdemann, U. *et al.* (2011) Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J. Vis. Exp.* (51), e2736 <http://dx.doi.org/10.3791/2736>
- 43 Tischer, S. *et al.* (2014) Rapid generation of clinical-grade antiviral T cells: selection of suitable T-cell donors and GMP-compliant manufacturing of antiviral T cells. *J. Transl. Med.* 12, 336
- 44 Melenhorst, J.J. *et al.* (2015) Graft versus leukemia response without graft-versus-host disease elicited by adoptively transferred multivirus-specific T-cells. *Mol. Ther.* 23, 179–183
- 45 Gerdemann, U. *et al.* (2013) Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol. Ther.* 21, 2113–2121
- 46 Haque, T. *et al.* (2007) Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110, 1123–1131
- 47 Wilkie, G.M. *et al.* (2004) Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein–Barr virus-associated diseases. *J. Immunother.* 27, 309–316
- 48 McGrath, W.J. *et al.* (2013) First generation inhibitors of the adenovirus proteinase. *FEBS Lett.* 587, 2332–2339
- 49 Kaneko, H. *et al.* (2001) Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus *in vitro*. *Antiviral Res.* 52, 281–288
- 50 Gainotti, R. *et al.* (2010) Real time PCR for rapid determination of susceptibility of adenovirus to antiviral drugs. *J. Virol. Methods* 164, 30–34

- 51 Smith, J.G. and Nemerow, G.R. (2008) Mechanism of adenovirus neutralization by human alpha-defensins. *Cell Host Microbe* 3, 11–19
- 52 Moyer, C.L. *et al.* (2011) Functional genetic and biophysical analyses of membrane disruption by human adenovirus. *J. Virol.* 85, 2631–2641
- 53 Wang, I.H. *et al.* (2013) Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution. *Cell Host Microbe* 14, 468–480
- 54 Suomalainen, M. *et al.* (2013) A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. *J. Virol.* 87, 12367–12379
- 55 Imelli, N. *et al.* (2009) Genetic reconstitution of the human adenovirus type 2 temperature-sensitive 1 mutant defective in endosomal escape. *Virol. J.* 6, 174
- 56 Yakimovich, A. *et al.* (2012) Cell-free transmission of human adenovirus by passive mass transfer in cell culture simulated in a computer model. *J. Virol.* 86, 10123–10137
- 57 Solly, K. *et al.* (2004) Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 363–372
- 58 Puntener, D. *et al.* (2011) Stepwise loss of fluorescent core protein V from human adenovirus during entry into cells. *J. Virol.* 85, 481–496
- 59 Prado-Prado, F.J. *et al.* (2008) Unified QSAR approach to antimicrobials. Part 3: first multi-tasking QSAR model for input-coded prediction, structural back-projection, and complex networks clustering of antiprotazoal compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5871–5880
- 60 Diaconu, I. *et al.* (2010) Human adenovirus replication in immunocompetent Syrian hamsters can be attenuated with chlorpromazine or cidofovir. *J. Gene Med.* 12, 435–445
- 61 Tollefson, A.E. *et al.* (2014) Cidofovir and brincidofovir reduce the pathology caused by systemic infection with human type 5 adenovirus in immunosuppressed Syrian hamsters, while ribavirin is largely ineffective in this model. *Antiviral Res.* 112, 38–46
- 62 Lenaerts, L. *et al.* (2005) Mouse adenovirus type 1 infection in SCID mice: an experimental model for antiviral therapy of systemic adenovirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4689–4699
- 63 Jogler, C. *et al.* (2006) Replication properties of human adenovirus *in vivo* and in cultures of primary cells from different animal species. *J. Virol.* 80, 3549–3558
- 64 Ternovoi, V.V. *et al.* (2005) Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. *J. Virol.* 79, 1308–1311
- 65 Kinchington, P.R. *et al.* (2005) Prospects for adenovirus antivirals. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 424–429
- 66 Toth, K. *et al.* (2005) Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 16, 139–146
- 67 Prince, G.A. *et al.* (1993) Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J. Virol.* 67, 101–111
- 68 Nemerow, G.R. *et al.* (2009) Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* 384, 380–388
- 69 Gaggar, A. *et al.* (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* 9, 1408–1412
- 70 Bergelson, J.M. *et al.* (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320–1323
- 71 Wang, H. *et al.* (2011) Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat. Med.* 17, 96–104
- 72 Trinh, H.V. *et al.* (2012) Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J. Virol.* 86, 1623–1637
- 73 Smith, J.G. *et al.* (2010) Adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 195–224
- 74 Lyle, C. and McCormick, F. (2010) Integrin $\alpha 5 \beta 1$ is a primary receptor for adenovirus in CAR-negative cells. *Virol. J.* 7, 148
- 75 Colpitts, C.C. and Schang, L.M. (2014) A small molecule inhibits virion attachment to heparan sulfate- or sialic acid-containing glycans. *J. Virol.* 88, 7806–7817
- 76 Dehecchi, M.C. *et al.* (2000) Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 268, 382–390
- 77 Uchio, E. *et al.* (2007) Antiadenoviral effect of the alpha 5 beta 1 integrin receptor ligand, GRGDSP peptide, in serotypes that cause acute keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica* 221, 326–330
- 78 Pietrantoni, A. *et al.* (2003) Bovine lactoferrin inhibits adenovirus infection by interacting with viral structural polypeptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2688–2691
- 79 Hippenmeyer, P.J. *et al.* (2002) Adenovirus inhibition by peptidomimetic integrin antagonists. *Antiviral Res.* 55, 169–178
- 80 Greber, U.F. *et al.* (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477–486
- 81 Suomalainen, M. *et al.* (1999) Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* 144, 657–672
- 82 Myers, N.D. *et al.* (2013) Directed evolution of mutator adenoviruses resistant to antibody neutralization. *J. Virol.* 87, 6047–6050
- 83 Smith, J.G. *et al.* (2008) Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J. Virol.* 82, 6492–6500
- 84 Strunze, S. *et al.* (2005) Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol. Biol. Cell* 16, 2999–3009
- 85 Strunze, S. *et al.* (2011) Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host Microbe* 10, 210–223
- 86 McEwan, W.A. *et al.* (2013) Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. *Nat. Immunol.* 14, 327–336
- 87 Zhao, H. *et al.* (2003) Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J. Virol.* 77, 11006–11015
- 88 Kneidinger, D. *et al.* (2012) Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery. *Antiviral Res.* 94, 195–207
- 89 Pettersson, U. and Roberts, R.J. (1986) Adenovirus gene expression and replication: a historical review. In *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. pp. 37–57, Cold Spring Harbor Laboratory
- 90 Stevens, J.L. *et al.* (2002) Transcription control by E1 A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 296, 755–758
- 91 Horwitz, G.A. *et al.* (2008) Adenovirus small e1a alters global patterns of histone modification. *Science* 321, 1084–1085
- 92 Ferrari, R. *et al.* (2014) Adenovirus small E1A employs the lysine acetylase p300/CBP and tumor suppressor Rb to repress select host genes and promote productive virus infection. *Cell Host Microbe* 16, 663–676
- 93 Eckstein, A. *et al.* (2010) Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res.* 88, 86–94
- 94 Chung, Y.S. *et al.* (2007) Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. *Arch. Virol.* 152, 1305–1314
- 95 Andersson, M.G. *et al.* (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J. Virol.* 79, 9556–9565
- 96 Weber, J.M. (2003) Adenain, the adenovirus endoprotease. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 50, 95–101 (review)
- 97 Mangel, W.F. and San Martin, C. (2014) Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses* 6, 4536–4570
- 98 Grosche, P. *et al.* (2015) Structure-based design and optimization of potent inhibitors of the adenoviral protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 438–443
- 99 Mac Sweeney, A. *et al.* (2014) Discovery and structure-based optimization of adenain inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 5, 937–941
- 100 Jurget, A. *et al.* (2012) Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects. *PLoS Pathog.* 8, e1002976
- 101 Perez, L. and Carrasco, L. (1994) Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* 75, 2595–2606
- 102 Patel, M.C. *et al.* (2014) Novel drugs targeting Toll-like receptors for antiviral therapy. *Future Virol.* 9, 811–829
- 103 Hendrickx, R. *et al.* (2014) Innate immunity to adenovirus. *Hum. Gene Ther.* 25, 265–284
- 104 Iacobelli-Martinez, M. and Nemerow, G.R. (2007) Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. *J. Virol.* 81, 1305–1312
- 105 Appledorn, D.M. *et al.* (2008) Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 *in vivo*. *J. Immunol.* 181, 2134–2144
- 106 Doronin, K. *et al.* (2012) Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science* 338, 795–798
- 107 Shirey, K.A. *et al.* (2013) The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature* 497, 498–502
- 108 Schreiner, S. *et al.* (2013) SPOC1-mediated antiviral host cell response is antagonized early in human adenovirus type 5 infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003775
- 109 Berscheminski, J. *et al.* (2014) Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression. *J. Virol.* 88, 6076–6092
- 110 Kim, Y.E. *et al.* (2011) Human cytomegalovirus infection causes degradation of Sp100 proteins that suppress viral gene expression. *J. Virol.* 85, 11928–11937
- 111 Full, F. *et al.* (2012) Herpesvirus saimiri antagonizes nuclear domain 10-instituted intrinsic immunity via an ORF3-mediated selective degradation of cellular protein Sp100. *J. Virol.* 86, 3541–3553
- 112 Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166
- 113 Yamamoto, M. *et al.* (2014) CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *J. Clin. Invest.* 124, 3479–3488

3.2. Antivirales derivados de piperazina

La mayoría de los compuestos bioactivos son heterocíclicos. Entre ellos, la piperazina y sus derivados tienen un papel fundamental en la química médica [94]. Originalmente, los derivados de piperazina se usaron durante la década de 1950 como agentes antihelmínticos, y actualmente se siguen empleando en farmacoterapia humana y veterinaria. La piperazina es una pequeña molécula de estructura rígida con un anillo de seis miembros que posee dos átomos de nitrógeno en posiciones opuestas del anillo, que ha sido hasta 2013 la segunda estructura más frecuente en todos los fármacos aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de USA (FDA) [95].

Las sustituciones o variaciones con diferentes grupos funcionales electrón-donador o electrón-atrayente sobre el anillo de piperazina resultan en distintas acciones biológicas sobre distintos microorganismos, receptores o enzimas virales (Figura 4). Por ello, los compuestos derivados de piperazinas presentan una gran variedad de actividades biológicas en diferentes áreas terapéuticas [96-101].

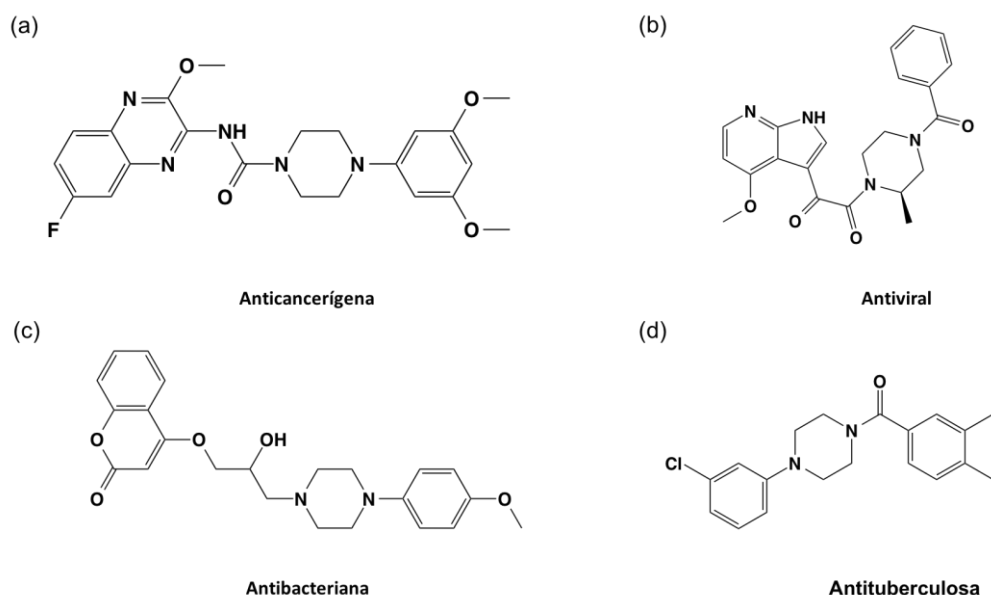


Figura 4. Ejemplos de la diversidad estructural y actividades biológicas de los derivados de piperazina. (a) Actividad anticancerígena, 1-(3,5-dimetoxifenil)-4-[(6-fluoro-2-metoxiquinoxalin-

3-il)aminocarbonil]piperazina; (b) Actividad antiviral, 1-[(2R)-4-benzoi l-2-metilpiperazin-1-il]-2-(4-metoxi-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)etano-1,2-diona; (c) Actividad antibacteriana; 4-(2-Hidroxi-3-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona; (d) Actividad antituberculosa; 4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)(3,4-dimetilfenil)metanona.

Entre estas actividades biológicas caben destacar las propiedades antivirales de ciertos derivados de piperazina que actúan mediante diversos mecanismos [94]. Se ha demostrado que algunos derivados de isatinil tiosemicarbazonas que incorporan piperazinas en su estructura poseen actividad *in vitro* que inhibe la infección frente al VIH sin causar citotoxicidad. El mecanismo de acción de estos compuestos se atribuye a interacciones estéricas del grupo metoxilo con los residuos aromáticos de la retrotranscriptasa de VIH [102,103]. Otros estudios ponen de manifiesto que compuestos análogos de la piperazina hidroxietilamina tienen la capacidad de inhibir la proteasa del VIH [104]. Además se ha demostrado que ciertos derivados de piperazina pueden inhibir infecciones causadas por virus de ARN como los Norovirus [105], responsables del 50% de los brotes de gastroenteritis en Estados Unidos y Rhinovirus [106], principal causante de los resfriados comunes. En un estudio reciente, se ha comprobado que compuestos derivados de clorciclizina, que poseen un anillo de piperazina en su estructura, presentan una potente actividad antiviral ($EC_{50} < 10 \text{ nM}$) frente al virus de la hepatitis C (VHC) [107]. Estas moléculas no manifestaron efectos hepatotóxicos en ratones ni citotoxicidad *in vitro* en hepatocitos humanos. Su mecanismo de acción es desconocido, aunque se ha demostrado que los compuestos no interfieren el proceso de entrada ni de replicación del VHC.

En cuanto a los antivirales empleados contra HAdV, recientemente se ha demostrado que compuestos pertenecientes a una pequeña librería de 2-piperazinona trisustituidos presentan una potente actividad anti-HAdV, inhibiendo procesos en los que está involucrada la maquinaria de replicación de ADN [108]. El esqueleto central de estos compuestos está formado por un anillo de 2-piperazinona junto con un sustituyente 2-benzofuranilo.

3.3. Inhibidores dirigidos a la AVP

Todos los HAdV dependen de la actividad de la AVP para poder completar su ciclo replicativo [109,110]. Se trata de una proteína de 23 KDa que se encuentra en el núcleo del HAdV y fue el primer miembro descrito de una nueva clase de proteasas de cisteína [24]. Las funciones fundamentales de la AVP incluyen la decapsidación de las partículas víricas durante la entrada del virus a la célula hospedadora [111], la escisión de varias proteínas precursoras requeridas para la formación de partículas virales maduras [24], y además, está implicada en la destrucción del citoesqueleto celular, lo que conduce a la lisis de la célula hospedadora [112].

La AVP tiene una función clave en la escisión y procesamiento de varias proteínas precursoras requeridas para la formación de partículas virales maduras, y para ello primero debe activarse. La activación de la AVP es un proceso en el que se requieren dos cofactores. El primer cofactor es la proteína pVIc, el péptido procedente de la región C-terminal de la proteína precursora pVI de HAdV [113-116]. Las proteínas AVP y pVIc se unen de manera covalente a través de puentes disulfuro a la molécula de AVP y forman el complejo AVP-pVIc [117]. Posteriormente, este complejo se une fuertemente al ADN viral formando la estructura ternaria AVP-pVIc-ADN, que es la forma más activa de la enzima [114,118,119]. Para procesar las proteínas precursoras necesarias para formar partículas víricas infectivas, el complejo AVP-pVIc se desliza sobre el ADN viral de manera unidimensional, con objeto de alcanzar y procesar sus sustratos que se encuentran también unidos al ADN [117].

Puesto que la AVP es esencial para la síntesis de virus infectivos, ésta representa una diana atractiva para el desarrollo de compuestos antivirales. La comparación de las estructuras cristalinas de la AVP en su forma inactiva y activa (AVP-pVIc) revela diferencias consideradas como posibles dianas para la interacción con fármacos [24]. Actualmente, la generación de nuevos compuestos inhibidores de la AVP está dirigida mayoritariamente a la inhibición del sitio activo y la zona conservada de unión al cofactor pVIc [120,121].

Mediante el diseño de compuestos basados en la estructuras cristalinas de estas dianas, ha podido generarse el compuesto líder NSC37249 que se une mediante inhibición competitiva (K_i 0,43 μ M) de manera simultánea al sitio activo y la zona de unión a pVlc [120]. Además, gran parte de los diseños de los inhibidores dirigidos a la interacción con el centro activo de la proteasa incorporan centros electrofílicos en una estructura capaz de reconocer el centro activo del enzima para que puedan establecer enlaces covalentes de reversibilidad variable con el residuo de azufre de la cisteína 122 del centro catalítico de la AVP [120,122,123]. En este sentido, el cribado de librerías de compuestos mediante estudios *in silico* ha permitido identificar el compuesto 2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenona que se une irreversiblemente a la AVP, mediante la sustitución de un grupo nitro del inhibidor por el residuo cisteína 122 en centro activo de la enzima, mediante una reacción de sustitución aromática nucleofílica [121].

Aunque la estructura cristalina del complejo AVP-pVlc ha sido resuelta, no ha sido posible obtener aún la estructura cristalizada de AVP-ADN, pVlc-ADN o del trímero AVP-pVlc-ADN [115]. La estructura resuelta de AVP-pVlc ha permitido caracterizar ampliamente el complejo desde el punto de vista estructural, además de conocer las interacciones entre residuos específicos en cada dominio. Sin embargo, para poder comprender el funcionamiento de la AVP a nivel molecular, son necesarias las estructuras de AVP, pVlc, AVP-pVlc, y pVI unidas a ADN, así como los complejos AVP-pVlc en presencia de sustratos con y sin ADN. Así, estos complejos proporcionarían información a nivel estructural de cómo el ADN aumenta la actividad de la AVP, la estructura, mecanismos y aminoácidos implicados en el deslizamiento sobre el ADN, además de ampliar el conocimiento del sitio activo de la AVP.

III. JUSTIFICACIÓN

El HAdV es un patógeno oportunista común raramente relacionado con sintomatología grave en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos como los receptores de trasplantes de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos, y gracias en parte a la implementación de nuevos y más potentes tratamientos inmunosupresores, las infecciones por HAdV han experimentado un aumento en su incidencia, presentando además elevada morbilidad y mortalidad. Además, los avances en las técnicas moleculares de diagnóstico y su cada vez más extendido uso, han permitido identificar a HAdV como un agente causal de casos esporádicos y brotes de NAC en individuos sanos.

A pesar de la situación actual, no existe un tratamiento específico aprobado por las Autoridades Sanitarias para el tratamiento de infecciones por HAdV, y no hay un consenso sobre la elección de un medicamento para el tratamiento. Los antivirales de amplio espectro disponibles en la clínica (cidofovir, ribavirina, inmunoglobulinas o ganciclovir) siguen siendo utilizados para tratar las infecciones por HAdV, pero con alta variabilidad con respecto a su eficacia y seguridad. El cidofovir, el fármaco de elección entre los disponibles, es un antiviral de amplio espectro frente a virus de ADN, pero presenta alta nefrotoxicidad asociada y baja biodisponibilidad, además Gilead, la empresa encargada de su producción anunció en 2014 que suspendía su producción por existir mejores opciones para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus (HCMV), la indicación para la que fue aprobado inicialmente.

Ante estas circunstancias, la síntesis química de pequeños compuestos con actividad antiviral potente, seleccionadas de librerías químicas grandes y diversas, ha ganado cada vez más atención. El desarrollo de protocolos para la rápida obtención de resultados en ensayos celulares e *in vitro* de una gran cantidad de nuevas moléculas, permite el descubrimiento y optimización de nuevos antivirales. En este contexto, se han identificado diferentes librerías de compuestos derivados de la piperazina que han demostrado ser una fuente efectiva para la generación de compuestos antivirales con diversos mecanismos de acción. Estudios realizados por nuestro grupo demuestran que

diferentes librerías de derivados de 2-piperazinona presentan actividad antiviral frente a HAdV a muy bajas concentraciones micromolares y una baja o nula citotoxicidad asociada. El mecanismo principal de acción de los compuestos más activos pertenecientes a estas librerías tiene como diana de acción el proceso de replicación del ADN del HAdV. La optimización de estos compuestos podrían servir para generar una molécula líder para el desarrollo de un antiviral específico para el tratamiento de infecciones por HAdV. Además, este compuesto supondrían una herramienta de gran valor para dilucidar los complejos eventos involucrados en el proceso de replicación del ADN de HAdV, lo cual a su vez podría ser de utilidad para mejorar el uso que se hace del HAdV como vector terapéutico.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Las hipótesis de este estudio son:

- 1.1. La actividad anti-HAdV mostrada por compuestos derivados de 2-piperazinona podría optimizarse mediante la generación de variaciones estructurales en torno a un núcleo central de piperazina.
- 1.2. El diseño y la síntesis de nuevos agentes antivirales derivados de la piperazina y dirigidos específicamente frente a la proteasa del HAdV, suponen una alternativa terapéutica de gran interés dada la implicación de esta proteína en pasos fundamentales del ciclo replicativo del virus.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto se centra en el diseño, síntesis, evaluación y optimización de nuevos compuestos con una estructura central de piperazina con elevada potencia anti-HAdV y una baja o nula citotoxicidad.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Síntesis, caracterización estructural y evaluación biológica de una quimioteca de derivados de piperazina con potencial actividad anti-HAdV.
- b) Establecer las relaciones estructura-actividad de los nuevos compuestos sintetizados.
- c) Caracterización del mecanismo de acción de los compuestos activos obtenidos como un primer paso en el desarrollo de un nuevo y específico antiviral frente al HAdV.

- d) Determinación del complejo ternario que conforma la proteasa activa del HAdV para comprender su regulación enzimática a nivel atómico.
- e) Síntesis, caracterización estructural y evaluación de nuevos inhibidores capaces de interaccionar e inhibir a la proteasa de HAdV.

V. RESULTADOS

1. Cribado y caracterización de moléculas con actividad anti-HAdV

1.1. Artículo II. New 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives as potential inhibitors of adenovirus infection. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships.

El objetivo principal de este trabajo fue optimizar la actividad anti-HAdV de una nueva librería de compuestos derivados de piperazina. Para ello, se diseñaron y sintetizaron, siguiendo una metodología sencilla y de alto rendimiento, tres nuevas generaciones de derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina y 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina. Los ensayos biológicos y el estudio de las relaciones estructura-actividad permitieron identificar, de un total de 52 compuestos, 6 derivados de fenilpiperazinas que inhibieron de manera significativa la infección por HAdV. Estos compuestos mostraron la capacidad de inhibir la replicación no solo de HAdV, sino también de HCMV, a bajas concentraciones micromolares y presentando poca o nula citotoxicidad. En base a los estudios biológicos, estas moléculas pueden bloquear las infecciones de HAdV y HCMV en distintas fases de su ciclo vital, evidenciando candidatos potenciales para el desarrollo de compuestos antivirales para el tratamiento de las infecciones por virus de ADN.

New 4-Acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine Derivatives as Potential Inhibitors of Adenovirus Infection. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–activity Relationships

Javier Sánchez-Céspedes,^{*,†} Pablo Martínez-Aguado,[†] Margarita Vega-Holm,[‡] Ana Serna-Gallego,[†] José Ignacio Candela,[‡] José Antonio Marrugal-Lorenzo,[†] Jerónimo Pachón,^{†,§} Fernando Iglesias-Guerra,^{*,‡} and José Manuel Vega-Pérez[‡]

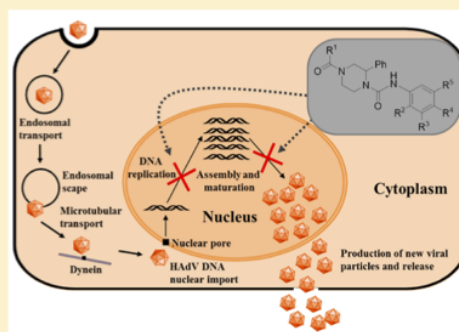
[†]Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, E41013 Seville, Spain

[‡]Department of Organic and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González 2, E-41071 Seville, Spain

[§]Department of Medicine, University of Seville, E-41009 Seville, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: The search for human adenovirus (HAdV)-specific antiviral drugs for the treatment of HAdV infections in immunocompromised patients continues to be a challenging goal for medicinal chemistry. Here, we report the synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships of a small molecules library. We have identified six phenylpiperazine derivatives that significantly inhibited HAdV infection. These six compounds showed the capacity to block HAdV and, in addition, human cytomegalovirus (HCMV) replications at low micromolar concentration, with little or no cytotoxicity. On the basis of our biological studies, these molecules block HAdV and HCMV infections in different phases of their life cycle, providing potential candidates for the development of a new family of antiviral drugs for the treatment of infections by DNA viruses.



1. INTRODUCTION

Human adenoviruses (HAdVs) have an icosahedral capsid containing a linear and double-stranded DNA genome of 34–36 kb in size.¹ Currently, have been described more than 60 HAdV types divided into seven subgroups or species (HAdV A–G).¹ In healthy individuals, HAdV infections are been usually associated with respiratory, ocular, and gastrointestinal diseases, typically self-limiting and rarely associated with severe clinical affections.^{2,3} On the other hand, in immunosuppressed patients like those receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT), especially in pediatric units, HAdV infections can be the cause of serious and often life-threatening viral diseases.^{2,4} In pediatric allo-HSCT recipients, HAdV infections occur in frequencies between 3 and 47%, with associated mortality rates of 2–80%.^{2,5} These wide ranges probably reflect the different diagnostic tools and methodologies used in the different studies. In solid organ transplant (SOT) recipients, HAdV rates of infection vary in function of the transplanted organ, from 10% in patients receiving liver and heart transplant to 22% in lung recipients.^{6,7} Nowadays, there are no specific antiviral drugs approved for HAdV infections and the available nonspecific therapeutic options to treat these infections do not show satisfactory results in terms of efficacy

or toxicity.⁸ Cidofovir is currently the drug of choice, although it has not been approved for specific use in HAdV infections. Ribavirin is only specific for HAdV subgroup C and also its plasma concentrations are at least 10 times below the required IC₅₀ value.^{9,10} Unlike ribavirin, cidofovir displays broad antiviral activity against all HAdV subgroups, however, it shows low oral bioavailability and significant renal toxicity.^{7,11} Moreover, the company Gilead Sciences, the manufacturer of cidofovir, formally requested the annulment of the authorization for cidofovir commercialization in Europe¹² due to problems with its manufacture and the availability of other therapeutic options for the indication it was approved for (retinitis by cytomegalovirus). Although brincidofovir (CMX001), which is a lipidic conjugate of cidofovir, is currently in phase III of its clinical trial (ClinicalTrials.gov no. NCT02087306),^{13,14} research on additional drugs with increased anti-HAdV efficacy is required.

In this context, 2-[2-(benzoylamino)benzoylamino]benzoic acid (**1a**, Figure 1) has been identified as a potent and nontoxic anti-HAdV compound.¹⁵ By screening three generations of

Received: February 26, 2016

Published: May 19, 2016

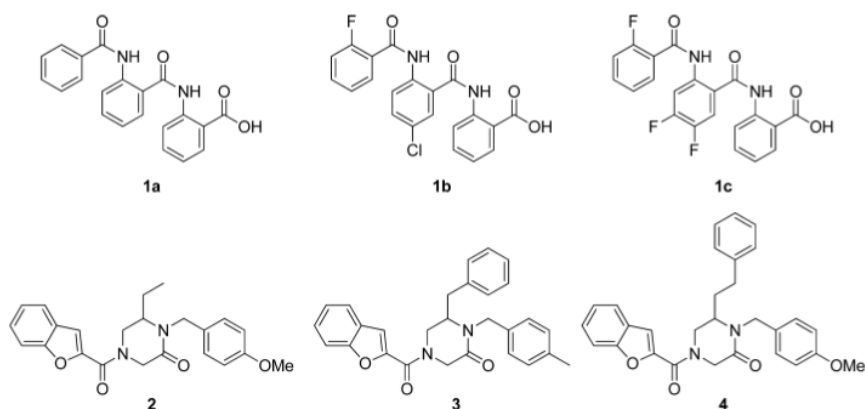


Figure 1. Hit structure (1a) and its analogues (1b, 1c), the most active compounds. Novel trisubstituted piperazin-2-one derivative, compound 2 (potent inhibitor of HAdV), and compounds 3–4 (arenavirus infection inhibitors).

designed analogues, two novel inhibitors with low cell toxicity and improved potency were described (1b and 1c, Figure 1).¹⁶

A number of synthetic small molecules with biological activity, particularly in the field of antiviral research, have led to new classes of antiviral drugs.^{17–20} Piperazinone derivatives had previously showed their utility as an effective source of antiviral compounds with different mechanisms of action. Compounds 2–4 (Figure 1), belonging to different libraries of trisubstituted piperazin-2-one derivatives, showed antiviral activity against HAdV (compound 2)²¹ and arenavirus (compounds 3–4).²² The piperazin-2-one derivative 2 has been already shown by our group to present significant anti-HAdV activity, targeting the HAdV DNA replication process,²¹ while the mechanism shown by piperazinones 3 and 4 against arenavirus was disruption of virion escape.²² In both cases, the basic structure of the molecules was constituted by a piperazine-2-one core together with a benzofuran-2-yl substituent.

On the basis of this previous work and on our experience in the synthesis of new small libraries of compounds with potential biological activity,²³ the major aim of this report was to design and synthesize, by a short and high yielded methodology, three generations of new 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-methylpiperazine and 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives, comprising a total of 52 compounds. While it is true that the ethyl substituent on the piperazin-2-one derivative 2 was previously found to show higher anti-HAdV activity than 2-phenylethyl substituents, neither of substituents methyl and phenyl were assayed.²¹ Our objective in this work was to generate a different scaffold, maintaining the piperazine backbone as the fundamental core in our new compounds to optimize the anti-HAdV activity previously obtained with the compound 2. We have established structure–activity relationships of these new compounds and identified six new 2-phenylpiperazine derivatives as potent inhibitors of HAdV and HCMV infections.

2. RESULTS AND DISCUSSION

Focusing on the main goal of our research group, we wished to explore a small library of new piperazine derivatives intending to find an optimized molecule, with increased anti-HAdV activity and reduced cytotoxicity. We have followed a relatively easy methodology to generate the necessary chemical diversity, always guided by the information generated with the structure–

activity relationship (SAR) analysis of the previously screened library.

Our general structure has been designed by an attempt to generate compound analogues of compound 2 (Figure 1) by changes in their structure. We made the structural modifications, illustrated in Figure 2, obtaining a general backbone with several structural variation points.

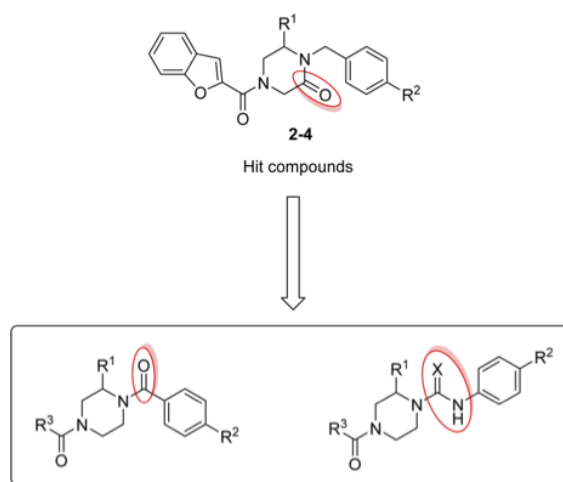


Figure 2. Design and general backbone of the new piperazine derivatives analogues of the hit compound 2.

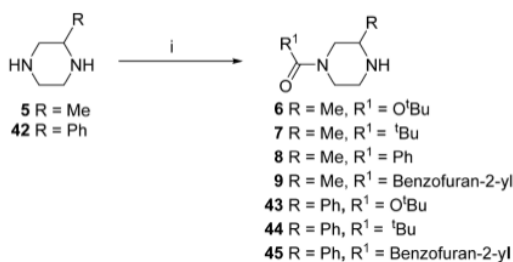
On the basis of the fact that piperazine derivatives had previously proved their utility as an effective source of antiviral compounds with different mechanisms of action,^{21,22,24} we have maintained this backbone as the fundamental core in our new compounds. The first structural modification made that generates the new group of compounds is the replacement of the piperazin-2-one ring by a piperazine one by moving the carbonyl group from the ring to the N-1 of the piperazine, through an amide or urea/thiourea function. The presence of this exocyclic carbonyl group becomes the common feature of our new compounds.

To generate chemical diversity, three points of variation in our general structure have been considered: (1) the substituent on the piperazine ring (R^1), (2) the substituent of the new

amide or urea functions at N-1 (R^2 groups with different electronic properties), and (3) different acyl functions located at the other nitrogen (urethane or amide groups with R^3 an aryl or alkyl group).

2.1. Chemistry: First-Generation Compounds. 2-Methylpiperazine **5** (Scheme 1) was employed as the precursor of

Scheme 1. Synthesis of Monoacyl Methylpiperazine Derivatives 6–9 and 43–45

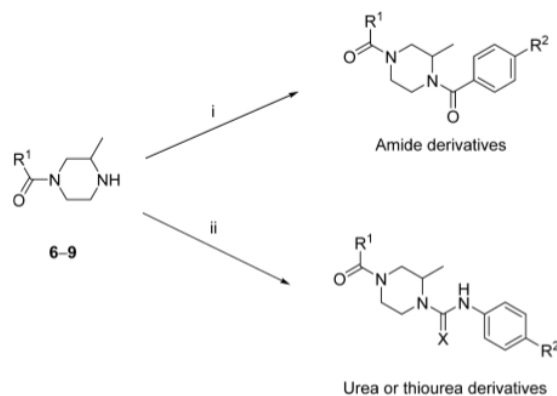


i: **5** or **42** 1 eq, Boc₂O or acyl halide 1 eq, pyridine 1.5 eq, dichloromethane

our new compounds. Through a chemoselective *N*-acylation reaction of 2-substituted piperazines, the acyl function at the less hindered nitrogen was introduced and the urethane and amide derivatives **6–9**, with different R^1 , were synthesized. A general synthetic route for these compounds is presented in Scheme 1.

From these monoacyl derivatives **6–9**, the carbonyl group at the other nitrogen was incorporated as amide or urea/thiourea groups (Scheme 2) in order to determine which organic

Scheme 2. Synthetic Methodology for the Preparation of the New Methylpiperazine Derivatives



i: **6–9** 1 eq, acyl halide 1.5 eq, pyridine 1.5, dichloromethane
ii: **6–9** 1 eq, isocyanate or isothiocyanate 1.2 eq, dichloromethane

function at this position was critical for the biological activity. As our structure is now different from models **2–4**, the nature of the substituent on the phenyl ring (R^2), electron withdrawing or electron-releasing group should be also evaluated. By choosing the appropriate acyl chloride or isocyanate/isothiocyanate reactants, following the route that is essentially described in Scheme 2, compounds **10–26** were obtained (Table 1).

2.2. Biology: First-Generation Compounds. Compounds **10–26** were screened for their potential anti-HAdV

activity by plaque assay, quantifying HAdV plaque formation in the presence of the candidate molecules, and by entry assay, previously reported screening assays to evaluate the capacity of the candidate molecules to block HAdV entry into the cells.^{21,22}

For the plaque assay, 293 β 5 cells were infected with HAdV5-GFP (in the presence of compound at 10 μM) (Table 1). From this generation of compounds, our primary screening identified 4 compounds (**12**, **13**, **22**, and **25**) that inhibited HAdV5-GFP plaque formation >90% compared to a control with the same volume of DMSO.

From this generation of compounds, one of our screenings identified four compounds (**12**, **13**, **22**, and **25**) that inhibited HAdV5-GFP expression (reporter gene expression) >90% in the plaque assay.

Compounds were also screened for inhibition of adenoviral replication (entry assay) essentially as has been described previously.^{15,21,22} Briefly, human A549 epithelial cells were infected with HAdV5-GFP in the presence of 50 μM of the candidate antiviral compound and incubated for 48 h. The obtained percentages of inhibition were not excessively high, for example, 0% for **12** and **21**, less than 20% for **10–12**, **15–17**, **19**, **20**, and **26**, and only few compounds gave moderate-high (50–90%) values of inhibition (**13**, **18**, **22–25**).

Table 2 shows the data found in the entry assay, as well as their evaluation for effects on cellular viability, for the most active compounds in the plaque assay.

Results showed that among the molecules of this first generation the most active possess the following structural features: they belong to general structure **B** (Table 1), containing urea or thiourea group at one nitrogen with an electron-withdrawing group, NO₂ (R^2 , Figure 2), and the acyl group on the other nitrogen is a urethane or a benzofuran-2-yl one (R^1 , Figure 2).

As for cytotoxic activity, compounds showed low toxicity at concentrations higher than 100 μM . According to this, compounds **12** and **22** were cytotoxic (Table 2) so that thiourea function was finally discarded for the next generation. On the other hand, it was necessary to decrease the cytotoxicity of compound **25**. From this generation, the safest compound that showed the best antiviral activity was compound **13**.

2.3. Chemistry: Second-Generation Compounds. On the basis of the information generated by the first-generation inhibitors screened library, we concluded that urethane or benzofuran carbonyl groups appear to be preferable for the activity at the nitrogen first functionalized as well as a urea group carrying electron-withdrawing groups at the other. As the next step, compounds **27–41** with variation at R (electron-withdrawing groups) on the phenyl ring, and with *tert*-butoxyl or benzofuran-2-yl as R^1 , were synthesized following the same efficient and high-yield methodology by reaction of the compounds **6** and **9** with the appropriate isocyanate (Table 3).

2.4. Biology: Second-Generation Compounds. Compounds **27–41** were evaluated following the same assays described previously in order to determine their potential anti-HAdV activity. Table 4 shows the percentages of inhibition obtained for each assay and their effect on cellular viability.

The effects on the activity of both the nature of the group and its position at the phenyl ring have been studied. As shown in Table 4, the five most active compounds obtained from this generation presented HAdV5-GFP plaque formation inhibition between 91 and 100% (compounds **30**, **31**, **33**, **35**, and **36**); all of them with different electron-withdrawing groups at different positions of the phenyl ring.

Table 1. First-Generation Compounds

Compound	 A				Percentage of plaque formation inhibition ^a
	Structure	R ¹	X	R ²	
10	A	O ^t Bu	-	NO ₂	34±2
11	A	O ^t Bu	-	OCH ₃	34 ± 4
12	B	O ^t Bu	S	NO ₂	100±0
13	B	O ^t Bu	O	NO ₂	91±3
14	B	O ^t Bu	O	OCH ₃	49±1
15	A	^t Bu	-	NO ₂	23 ± 3
16	A	^t Bu	-	OCH ₃	0
17	B	^t Bu	S	NO ₂	64±8
18	B	^t Bu	O	NO ₂	0
19	B	^t Bu	O	OCH ₃	0
20	A	Ph	-	NO ₂	0
21	A	Ph	-	OCH ₃	0
22	B	Ph	S	NO ₂	94±2
23	B	Ph	O	NO ₂	72±3
24	B	Ph	O	OCH ₃	0
25	B	Benzofuran-2-yl	O	NO ₂	94±1
26	B	Benzofuran-2-yl	O	OCH ₃	34±14

^aPercentage inhibition of HAdV5-GFP in a plaque assay at 10 μ M using the 293 β 5 cell line. The results represent means \pm SD of triplicate samples from three independent experiments. See the [Experimental Section](#) for details.

Table 2. Percentage of Control HAdV5-GFP Inhibition and Cytotoxicity Assay Data for Compounds 12, 13, 22, and 25

compd	percentage of control HAdV5-GFP inhibition ^a	CC ₅₀ (μ M) ^b
12	0	26.3 \pm 1.6
13	65 \pm 6	143.0 \pm 3.3
22	41 \pm 11	31.4 \pm 2.8
25	86 \pm 2	51.1 \pm 7.3

^aPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in an entry assay at 50 μ M using the A549 cell line. ^bCytotoxic concentration₅₀. The results represent means \pm SD of triplicate samples from three independent experiments.

For those *tert*-butoxycarbonyl derivatives 27–31, Cl, CF₃, and *ortho* NO₂ groups did not improve the activity of compound 13 (27, 28, and 29 respectively, [Table 4](#), entries 1–3). However, compounds 30 and 31 were very active but very toxic as well ([Table 4](#), entries 4 and 5). It is important to notice that compounds 30 and 31 possess a disubstituted phenyl ring (Cl and CF₃).

For those benzofuran-2-carbonyl derivatives, the lack of activity of compound 41 indicates that the presence of

substituents on the phenyl ring is needed. Among the different groups evaluated at *para* position, Cl, CF₃, CN, and F (32, 33, 34, and 35, respectively), best activities were found with CF₃ and F, but CF₃ derivative 33 presented some cytotoxicity.

For this generation, the best data were obtained with compounds 35 and 36 ([Table 5](#), entries 9 and 10), which were very active and showed high CC₅₀ (>200 μ M). Compound 36 was synthesized in an attempt to obtain an analogue of 25 by changing the pattern of substitution of the phenyl ring from *para* (compound 25) to *ortho* position (compound 36) that resulted in a compound with similar activity and reduced toxicity. For other electron-withdrawing groups (F, Br) located at *ortho* position, no significant anti-HAdV activity was detected (compounds 37 and 38).

2.5. Chemistry: Third-Generation Compounds. A further round of optimization was performed to give a third generation of inhibitors by preserving structural features of the more active compounds from the second generation (*tert*-butoxyl or benzofuran-2-yl as R¹ and a phenyl ring linked through a urea function with electron-withdrawing groups) and by changing the last point of structural variability of our general backbone, the substituent on the piperazine ring ([Figure 2](#)). In

Table 3. Second-Generation Compounds

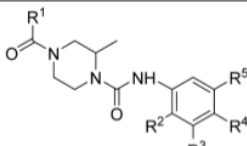
Compound					
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
27	O ^t Bu	H	H	Cl	H
28	O ^t Bu	H	H	CF ₃	H
29	O ^t Bu	NO ₂	H	H	H
30	O ^t Bu	Cl	H	H	CF ₃
31	O ^t Bu	H	CF ₃	Cl	H
32	Benzofuran-2-yl	H	H	Cl	H
33	Benzofuran-2-yl	H	H	CF ₃	H
34	Benzofuran-2-yl	H	H	CN	H
35	Benzofuran-2-yl	H	H	F	H
36	Benzofuran-2-yl	NO ₂	H	H	H
37	Benzofuran-2-yl	F	H	H	H
38	Benzofuran-2-yl	Br	H	H	H
39	Benzofuran-2-yl	F	H	F	H
40	Benzofuran-2-yl	OCH ₃	H	H	H
41	Benzofuran-2-yl	H	H	H	H

Table 4. Inhibition of HAdV Infection in the Entry and Plaque Assays and Effects on Cellular Viability for Compounds 27–41

compd	percentage of control HAdV5-GFP inhibition ^a	percentage of plaque formation inhibition ^b	CC ₅₀ (μM) ^c
27	37 ± 3	62 ± 0.3	150.1 ± 1.1
28	57 ± 6	31 ± 15	137.1 ± 24.3
29	0	50 ± 3	
30	31 ± 7	96 ± 2	63.5 ± 8.2
31	72 ± 6	100 ± 0	20.8 ± 0.6
32	36 ± 5	70 ± 11	144.2 ± 20.8
33	60 ± 23	92 ± 4	82.2 ± 24.3
34	78 ± 8	83 ± 1	117.9 ± 30.2
35	0	92 ± 5	220.5 ± 28.9
36	0	91 ± 1	202.6 ± 4.1
37	0	51 ± 4	
38	44 ± 12	56 ± 19	
39	0	34 ± 13	
40	0	16 ± 5	
41	0	11 ± 26	

^aPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in an entry assay at 50 μM using the A549 cell line. ^bPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in a plaque assay at 10 μM using the 293β5 cell line. ^cPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in a 50% cell cytotoxic concentration. The results represent means ± SD of triplicate samples from three independent experiments. See the [Experimental Section](#) for details.

this case, 2-phenylpiperazine (42) was employed as starting material, and through the general synthetic route shown in

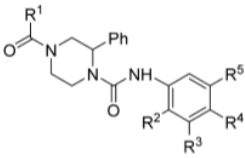
[Scheme 1](#), monoacyl derivatives 43–45 were obtained in high yields.

In the same way, the reaction of 43–45 with the appropriate isocyanate gave compounds 46–65 in high yields ([Table 5](#)).

2.6. Biology: Third-Generation Compounds. In the same way that all compounds previously prepared, the potential anti-HAdV activity of compounds 45–65 was evaluated ([Table 6](#)).

In general terms, compounds from this generation presented high activity (only two out of 20 gave percentage of inhibition <70%). For those *tert*-butoxycarbonyl derivatives 46–55, only 46 presented high inhibitory activity (NO₂ group) in the absence of cytotoxicity, while Cl, CF₃, F, and CN groups at the *para* position did not improve activity. The presence of Cl or CF₃ (47 and 48, respectively, [Table 6](#), entries 2 and 3) resulted in significant cytotoxicity. In the same way, compounds 51, 52, and 53 presented high inhibitory activity but exhibited significant cytotoxicity as well ([Table 6](#), entries 6 and 7). It is important to notice that compound 51 possessed a NO₂ group at the *ortho* position while 52 and 53 possessed a disubstituted phenyl ring (Cl and CF₃ at different positions). They were designed to be phenylpiperazine derivatives analogues of the corresponding methyl piperazine derivatives, 29, 30, and 31, respectively. The replacement of the methyl by a phenyl gave the active compound 51 (29 was not active) but with certain cytotoxicity. In the case of compounds 52 and 53, the desired target was to get similar inhibitory activity than 30 and 31 but without their cytotoxicity. Compound 52 resulted in a more active compound with less cytotoxicity (52 vs 30), whereas

Table 5. Third-Generation Compounds

Compound					
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
46	O ^t Bu	H	H	NO ₂	H
47	O ^t Bu	H	H	Cl	H
48	O ^t Bu	H	H	CF ₃	H
49	O ^t Bu	H	H	F	H
50	O ^t Bu	H	H	CN	H
51	O ^t Bu	NO ₂	H	H	H
52	O ^t Bu	Cl	H	H	CF ₃
53	O ^t Bu	H	CF ₃	Cl	H
54	O ^t Bu	H	H	OCH ₃	H
55	O ^t Bu	H	H	CH ₃	H
56	^t Bu	H	H	NO ₂	H
57	^t Bu	H	H	CN	H
58	^t Bu	H	H	OCH ₃	H
59	Benzofuran-2-yl	H	H	NO ₂	H
60	Benzofuran-2-yl	H	H	Cl	H
61	Benzofuran-2-yl	H	H	CF ₃	H
62	Benzofuran-2-yl	H	H	F	H
63	Benzofuran-2-yl	H	H	CN	H
64	Benzofuran-2-yl	NO ₂	H	H	H
65	Benzofuran-2-yl	Cl	H	H	CF ₃

compound 53 resulted as cytotoxic as 31 despite presenting significant inhibitory activity.

When a benzofuran-2-yl group is present those compounds possessing a *para* substituted phenyl ring were more active than their analogues *tert*-butoxycarbonyl derivatives. This fact gave not only the NO₂ derivative as a new active compound 59 but also Cl and CN ones (60 and 63). CF₃ and F derivatives 61 and 62 were improved compounds in terms of anti-HAdV activity compared to 48 and 49; however, they still exhibited high toxicity. The *ortho* NO₂ derivative 64 was very active and noncytotoxic, while its *tert*-butoxycarbonyl analogue 51 presented low toxicity. In addition, the disubstituted benzofur-

an-2-yl derivative 65 was prepared as analogue of 52, presenting also high inhibitory activity and low cytotoxicity.

Finally, due to the fact that the general backbone has been changed related to the previous generations, three phenyl-piperazine derivatives (56–58) having an acyl group different from the two mentioned above and a urea function were prepared and evaluated. The substituents located at the phenyl ring were both electron-withdrawing and electron-releasing groups. None of them gave anti-HAdV activity.

Compounds 46, 59, 60, 63, 64, and 65 were selected for their antiviral activity in the plaque assay, from 96 to 100% inhibition and their low cytotoxicity. These active compounds were further evaluated for measurement of 50% compound

Table 6. Inhibition of HAdV Infection in the Entry and Plaque Assays and Effects on Cellular Viability for Compounds 46–65

compd	percentage of control HAdV5-GFP inhibition ^a	percentage of plaque formation inhibition ^b	CC ₅₀ (μM) ^c
46	80 ± 1	96 ± 4	161.3 ± 45.2
47	96 ± 1	86 ± 6	17.1 ± 4.2
48	75 ± 9	71 ± 0.1	42.1 ± 28.6
49	70 ± 2	76 ± 0.5	110.1 ± 8.1
50	45 ± 13	67 ± 16	91.3 ± 61.5
51	62 ± 10	100 ± 0	82.2 ± 9.1
52	89 ± 1	100 ± 0	93.4 ± 0.7
53	93 ± 0.3	100 ± 0	27.5 ± 0.0
54	39 ± 10	79 ± 1	133.3 ± 58.8
55	65 ± 23	63 ± 0.2	165.2 ± 17.4
56	60 ± 6	44 ± 13	102.4 ± 8.4
57	74 ± 10	84 ± 7	147.2 ± 37.9
58	0	70 ± 3	198.7 ± 33.6
59	84 ± 5	100 ± 0	193.9 ± 1.7
60	33 ± 3	100 ± 0	193.5 ± 9.2
61	61 ± 4	100 ± 0	70.7 ± 21.4
62	88 ± 1	99 ± 0.2	12.5 ± 0.8
63	63 ± 1	98 ± 0.3	199.8 ± 0.3
64	38 ± 8	100 ± 0	131.9 ± 6.1
65	30 ± 0.3	97 ± 1	130.8 ± 17.8

^aPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in an entry assay at 50 μM using the A549 cell line. ^bPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in a plaque assay at 10 μM using the 293β5 cell line. ^cPercentage of control HAdV5-GFP inhibition in an 50% cell cytotoxic concentration. The results represent means ± SD of triplicate samples from three independent experiments. See the Experimental Section for details.

inhibition concentration (IC₅₀), the selectivity index (SI) for each compound, and also to gain some mechanistic understanding for inhibition (Table 7).

2-Phenylpiperazines 46 and 59 reproducibly inhibited HAdV5 infection in a dose-dependent manner at high multiplicity of infection (MOI), 2000 viral particles (vp)/cell, showing IC₅₀ values of 32.51 and 26.67 μM, respectively (Supporting Information, Figure S3). In subsequent screening using a lower input of virus (0.06 vp/cell), these compounds also showed dose-dependent activity with 96–100% inhibition of plaque formation at concentrations of 10 μM (Table 7, Supporting Information, Figure S2). On the other hand, compounds 60, 63, 64, and 65 inhibited HAdV5 infection to a lesser extent in the entry assay while keeping the high dose-

dependent inhibition in the plaque assay (Table 7, Supporting Information, Figure S2). We also tested the antiviral activity of these 2-phenylpiperazines against a species B HAdV (HAdV16) and found similar levels of inhibition to those seen with HAdV5 in the plaque assay (Table 7, Supporting Information, Figure S2). The IC₅₀ values for the hit compounds against HAdV5 and HAdV16 are summarized in Table 7.

2.7. Impact on HAdV Entry. The entry assay we used for this work indicated that treatment with 2-phenylpiperazines 46, 59, and 63 inhibited expression of the HAdV-GFP transgene in a significant way at different levels depending on the compound, but this determination did not give us indications of their potential mechanism of inhibition. Only compounds 46 and 59 were able to reach an IC₅₀ at concentrations below their CC₅₀ concentrations (data not show). To clarify if these molecules were able to block some of the steps of the entry pathway, we carried out an assay to quantitatively measure the HAdV genome accessibility to the nucleus. After endosomal escape mediated by protein VI, the partially uncoated HAdV capsids are transported to the nuclear membrane via the microtubule network.²⁵ At this point, the HAdV genome is imported into the nucleus along with protein VII via the nuclear pore complex.²⁶ We argued that if any of these 2-phenylpiperazines inhibited any of the steps of the HAdV entry that would be reflected in the number of HAdV genomes that reach the host nucleus after a synchronized infection. As showed in Figure 3A, there were not significant differences in the amount of HAdV DNA isolated from the nucleus of cells treated with any of these 2-phenylpiperazines versus those treated with DMSO. We also measured the DNA copy number of the cellular housekeeping gene GAPDH in both the nucleus and the cytoplasm as a control for the purity of nuclear isolation. Our results indicated that we were specifically measuring the HAdV DNA that reached the nucleus and that the compounds did not alter any of the steps leading up to this late entry event (Figure 3B).

2.8. Impact on HAdV Replication. The next step was to examine the effect that 2-phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, 64, and 65 had on virus replication using a virus burst size assay which measures the production of infectious virus particles. We used the wild-type virus and calculated the TCID₅₀ of an infection in the presence and absence of the anti-HAdV molecules. As summarized in Table 8, treatment with our 2-phenylpiperazine derivatives was associated with overall reductions in virus yield of 9.9–211.7-fold for HAdV5 and 27.4–265.5-fold for HAdV16.

Table 7. 2-Phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, 64, and 65 IC₅₀, CC₅₀, and SI value

compd	IC ₅₀ (μM) ^a		CC ₅₀ (μM) ^b	selectivity index (SI) ^c		virus yield reduction ^d	
	HAdV5	HAdV16		HAdV5	HAdV16	HAdV5	HAdV16
46	3.4 ± 1.0	4.8 ± 1.2	161.3 ± 45.2	47.3	33.6	211.7 ± 44.1	265.5 ± 29.1
59	2.1 ± 0.1	3.5 ± 1.0	193.9 ± 1.7	93.5	55.4	35.7 ± 13.5	34.6 ± 11.6
60	2.5 ± 1.2	3.4 ± 0.9	193.5 ± 9.2	79.0	56.9	9.9 ± 3.4	27.4 ± 16.9
63	4.7 ± 0.1	3.9 ± 1.1	199.8 ± 0.3	42.7	51.2	16.9 ± 5.2	60.9 ± 12.5
64	2.5 ± 0.0	2.3 ± 0.1	131.8 ± 6.0	53.3	57.3	34.5 ± 12.6	46.5 ± 10.8
65	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.2	130.8 ± 17.8	116.2	72.7	60.3 ± 15.2	33.2 ± 7.3

^aInhibitory concentration 50 at low MOI in a plaque assay. ^bCytotoxic concentration 50. ^cSelectivity index value was determined as the ratio of cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) to inhibitory concentration 50 (IC₅₀) in a plaque assay for each compound. ^dFold-reduction in virus yield as the ratio of particles produced in the presence of DMSO divided by the yield in the presence of each one of the 2-phenylpiperazine derivatives (50 μM). The results represent means ± SD of triplicate samples from three independent experiments

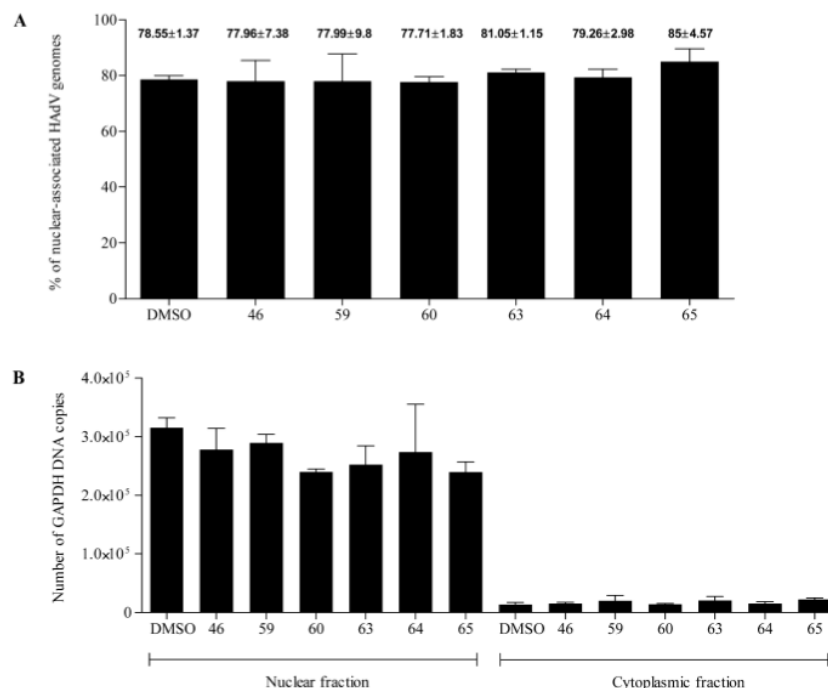


Figure 3. (A) Nuclear association of HAdV DNA. (B) Control for the specificity of nuclear DNA purification. Bars represent means \pm SD of triplicate experiments.

Table 8. Effects of 2-Phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, 64, and 65 on HAdV5 and HCMV DNA Replication

compd	HAdV5 ^a	HCMV ^a
46	80.7 \pm 2.5	99.6 \pm 0.4
59	80.9 \pm 0.2	99.9 \pm 0.1
60	78.9 \pm 4.2	98.2 \pm 2.1
63	88.5 \pm 2.7	99.9 \pm 0.1
64	73.1 \pm 13.3	97.9 \pm 0.9
65	33.1 \pm 0.5	98.2 \pm 0.4

^a% inhibition of DNA replication in the presence of 2-phenylpiperazines (50 μ M) compared to a control in the presence of DMSO. The results represent means \pm SD of triplicate samples from three independent experiments.

Additionally, we performed quantitative real-time PCR (qPCR) to measure HAdV DNA replication efficiency in the presence of these compounds. HAdV5-infected A549 cells were incubated for 24 h at 37 °C before washing to remove unbound virions. DNA was extracted at this early time point to avoid the influence of newly generated viral particles derived from subsequent rounds of infection occurring 32–36 h post infection.²⁷ The presence of compounds 46, 59, 60, 63, and 64 at 50 μ M concentration significantly inhibited HAdV5 DNA replication by more than 50%, with no significant effect on the cellular control gene GAPDH (Table 8). Only compound 65 did not show a significant inhibition on HAdV5 DNA replication when compared to a control treated with the same concentration of DMSO.

2-Phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, 64, and 65 inhibit DNA replication of HAdV5 and HCMV. They reduced de novo production of HAdV5 and HCMV DNA copies compared to a positive control 24 h postinfection in a quantitative PCR assay

(72 h in case of HCMV). The results represent means \pm SD of triplicate samples from three independent experiments.

2.9. Impact on HCMV Replication. We explored the possible broad-spectrum inhibitory activity of these 2-phenylpiperazine derivatives on HCMV. Surprisingly, evaluation of HCMV DNA replication 72 h after infection of MRC-5 cells revealed that 2-phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, 64, and 65 generated a significant inhibition of HCMV DNA replication (Table 8). Quantitative PCR for the GAPDH gene was included as control, again showing no differences between samples. These results suggest a mechanism for the inhibition of viral infection involving the machinery that participates in viral DNA replication.

We demonstrated that any of our 2-phenylpiperazines inhibited the cell entry process up to DNA delivery to the nucleus because the HAdV DNA accumulated at the nucleus of the cell host without significant difference compared to a nontreated control. However, and as it happened with compound 2 (Figure 1), we cannot rule out the possibility that these compounds may block arrival of HAdV genome at the proper location or the HAdV DNA chromatization, a prerequisite for HAdV DNA transcription and subsequent replication. Nucleotide and nucleoside analogues (i.e., cidofovir) have been shown to have broad activity against multiple dsDNA virus including HCMV and HAdV via inhibition of DNA replication targeting the viral DNA polymerases.² On the other hand, other novel antivirals, such as maribavir among others, have been described to interfere with different steps in the replicative cycle of DNA viruses.^{28–31}

Compound number 2 (Figure 1) had previously showed a significant inhibition of HAdV infection targeting the HAdV DNA replication process.²¹ This piperazinone showed higher IC₅₀ values than the six 2-phenylpiperazines described in this work, both at high and low MOIs. However, the virus yield

reduction values obtained with the 2-phenylpiperazines derivatives were significantly higher than those obtained with the molecule number 2 in all cases except for the derivative 60 and just in the case of HAdV5. These 2-phenylpiperazines derivatives have showed overall reductions in a virus yield of 1.12–14-fold for HAdV5 and 3–27-fold for HAdV16 respect to the reductions obtained with molecule 2. These data justify the work carried out to optimize the anti-HAdV activity of compound 2.

On the other hand, other piperazine adamantane derivatives had shown to be powerful inhibitors of Ebola virus infection by interfering with the virus glycoprotein binding to the endosomal membrane protein Niemann-PickC1 (NPC1).^{24a} These results highlight the potential of piperazine derivatives as a source of antiviral drugs with a number of different mechanisms of action and targeted to different and unrelated viruses.

In summary, compounds 46, 59, 60, 63, and 64 cause a significant decrease in HAdV and HCMV DNA replication and their activity could be the consequence of directly interfering with a protein involved in this process or, alternatively, these compounds may impact transcription of the immediate early genes, which is a prerequisite for subsequent DNA replication. By quantifying the mRNA copy number of the immediate early gene E1A of HAdV5 after 6 h of infection, we verified that any of the selected compounds exhibited significant inhibition of HAdV mRNA transcription (data not shown). In any case, the broad spectrum activity presented by compounds 46, 59, 60, 63, and 64 suggest a specific protein target that could be either cellular or viral. Compound 65 did not seem to affect HAdV5 DNA replication or mRNA transcription but showed significant inhibition of HCMV DNA replication; thus, its mechanism of HAdV inhibition should be related with later steps on the HAdV infection cycle, such as the inhibition of its protease activity and, consequently, the viral particle assembly and maturation processes, or the release of the new infectious particles. HAdV protease has been demonstrated to be involved in HAdV entry, specifically in the uncoating of virus particles as well as in the formation of mature virions by the cleavage of core precursor proteins and in the lysis of the host cell by the cleavage of cytokeratins.^{32–35} Piperazine derivatives, as potential reversible inhibitors of the HAdV protease, showing low dissociation constants between inhibitor and protease, have been previously showed to inhibit cysteine proteases like that of HAdV (adenain).³⁶

3. CONCLUSION

It can be concluded that, for 2-phenylpiperazine derivatives, the presence of a benzofuran-2-yl group contributes to increase the antiviral activity as well as, for some substituents, the CC₅₀ giving more active and less cytotoxic compounds.

2-Phenylpiperazines 46, 59, 60, 63, and 64 have proven to be significant and broad-spectrum inhibitors of DNA replication both in HAdV and HCMV. Moreover, 2-phenylpiperazine 65 has also demonstrated significant broad antiviral activity but its inhibitory activity must take place later after DNA replication. Although further optimization and characterization of their mechanisms of action will be required for these compounds, they could potentially represent strong hit candidates for the development of a new class of antiviral compounds.³⁷

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Chemistry. General Chemistry Methods. All reagents, solvents, and starting materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. The crude reaction mixtures were concentrated under reduced pressure by removing the organic solvents in a rotary evaporator. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using Kieselgel 60 F₂₅₄ (E. Merck) plates and UV detector for visualization. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 (E. Merck) with the indicated eluent. All reported yields are of purified products. Melting points were obtained on a Stuart melting point apparatus SMP 10 and are uncorrected. Mass spectra were recorded on a Micromass AUTOSPECQ mass spectrometer: EI at 70 eV and CI at 150 eV, HR mass measurements with resolutions of 10000. FAB mass spectra were recorded using a thioglycerol matrix. NMR spectra were recorded at 25 °C on a Bruker AV500 spectrometer at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. The chemical shifts (δ) reported are given in parts per million (ppm), and the coupling constants (J) are in hertz (Hz). ¹H chemical shift values (δ) are referenced to the residual nondeuterated components of the NMR solvents (δ = 2.54 ppm for DMSO, δ = 7.26 ppm for CDCl₃). The ¹³C chemical shifts (δ) are referenced to CDCl₃ (central peak, δ = 77.16 ppm) as the internal standard. The spin multiplicities are reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), or br s (broad singlet). COSY, DEPT, HSQC, and NOESY experiments were performed to assign the signals in the NMR spectra. The purity of final compounds was evaluated by C, H, N analysis. The purity of all the final compounds was confirmed to be $\geq 95\%$ by combustion.

General Procedure 1: Chemoselective N-Acylation Reaction of 2-Substituted Piperazines (6–9, 43–45). 2-Substituted piperazine (6.0 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (80 mL) and cooled to 0 °C. A solution of the appropriate acylating agent in dichloromethane (6.0 mmol, 20 mL) was added dropwise in 30 min and then pyridine (9 mmol). The reaction mixture was kept into an ice–water bath with stirring 12 h and left at room temperature until TLC showed that all the starting material had reacted. The reaction mixture was evaporated to dryness to obtain the corresponding monoacyl derivative. Column chromatography gave the pure compounds in high yields.

1-tert-Butoxycarbonyl-3-methylpiperazine (6).³⁸ The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using dichloromethane–methanol (15:1) as eluent (0.90 g, 75% yield). MS (CI): m/z 201 (20%) [$M + H$]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3.75–3.71 (m, 2H), 2.85–2.82 (m, 1H), 2.75–2.69 (m, 1H), 2.60–2.54 (m, 3H), 2.39–2.34 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.96 (d, J = 6.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.5, 79.3, 51.2, 50.5, 45.5, 44.4, 28.6, 19.3. HRMS (m/z): calcd for C₁₀H₂₀N₂O₂ 200.1528 [M]⁺; found 200.1525.

3-Methyl-1-pivaloylpiperazine (7).³⁹ The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using dichloromethane–methanol (15:1) as eluent (0.85 g, 77% yield). MS (CI): m/z 185 (90%) [$M + H$]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4.11–4.02 (m, 2H), 2.89–2.73 (m, 2H), 2.59–2.52 (m, 2H), 2.45–2.38 (m, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.97 (d, J = 6.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.9, 80.2, 51.2, 45.2, 44.6, 40.3, 28.6, 19.0.

1-Benzoyl-3-methylpiperazine (8).⁴⁰ The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using dichloromethane–methanol (15:1) as eluent (1.0 g, 81% yield). MS (CI): m/z 205 (100%) [$M + H$]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.45–7.34 (m, 5H), 3.91–3.60 (m, 2H), 2.94–2.87 (m, 3H), 2.70–2.59 (m, 3H), 0.96 (d, J = 5.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168.8, 136.1, 128.9, 128.0, 126.4, 50.0, 44.9, 40.0, 18.5. HRMS (m/z): calcd for C₁₂H₁₇N₂O 205.1343 [$M + H$]⁺; found 205.1341.

1-(Benzofuran-2-carbonyl)-3-methylpiperazine (9). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using dichloromethane–methanol (40:1) as eluent (1.1 g, 74% yield), mp 101–103 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.7–7.5 (m, 5H), 4.47 (br s, 2H), 3.10 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 2.94–2.86 (m, 2H), 1.97 (br s, 2H), 1.13 (d, J = 5.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8, 154.6, 149.1, 127.0, 126.4, 123.6, 122.2, 111.9, 111.8, 51.1,

46.1, 19.4. Anal. Calcd for $C_{14}H_{17}N_2O_2$: C, 68.55; H, 6.99; N, 11.42. Found: C, 68.32; H, 6.62; N, 11.22.

1-tert-Butoxycarbonyl-3-phenylpiperazine (43). The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (1.04 g, 66% yield), mp 103–105 °C. MS (CI): m/z 263 (100%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.4–7.3 (m, 5H), 4.05 (br s, 2H), 3.70 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.07 (m, 1H), 2.9–2.8 (m, 2H), 2.72 (br s, 1H), 1.90 (br s, 1H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 154.8, 141.5, 128.5, 127.8, 127.0, 79.7, 60.3, 51.5, 46.1, 43.4, 28.5. HRMS (m/z): calcd for $C_{15}H_{23}N_2O_2$ 263.1754 $[M + H]^+$; found 263.1748.

3-Phenyl-1-pivaloylpiperazine (44). The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using dichloromethane–methanol (70:1) as eluent (1.36 g, 92% yield). MS (CI): m/z 247 (90%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.6–7.5 (m, 5H), 4.50 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.43 (t, $J = 13.4$ Hz, 1H), 3.36 (t, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.05 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 2.84 (m, $J = 3.3$ Hz, $J = 12.5$ Hz), 1.27 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 176.4, 134.5, 129.6, 129.3, 127.8, 60.1, 48.6, 44.5, 42.1, 38.8, 28.3.

1-(Benzofuran-2-carbonyl)-3-phenylpiperazine (45). The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (1.21 g, 66% yield). MS (CI): m/z 307 (100%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.8–7.3 (m, 10H), 4.39 (br s, 2H), 3.78 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.83 (dt, $J = 2.8$ Hz, $J = 12.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 158.9, 153.9, 148.4, 141.7, 128.3, 127.5, 126.9, 126.7, 126.4, 123.7, 122.4, 111.7, 110.7, 59.8, 22.4. HRMS (m/z): calcd for $C_{19}H_{19}N_2O_2$ 307.1441 $[M + H]^+$; found 307.1433. Anal. Calcd for $C_{19}H_{18}N_2O_2$: C, 74.49; H, 5.92; N, 9.14. Found: C, 74.61; H, 6.18; N, 8.93.

General Procedure 2: Synthesis of the Amide Derivatives (10, 11, 15, 16, 20, and 21). To a solution of the 1-monoacyl derivatives (6–8) (1.0 mol) in dry dichloromethane (30 mL) was added the corresponding acyl halide (1.5 mmol) and pyridine (1.5 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature until TLC showed that all the starting material had reacted. The reaction mixture was successively washed with diluted hydrochloric acid, aqueous saturated solution of sodium bicarbonate and water, dried ($MgSO_4$), filtered, and the filtrate evaporated to dryness. The compounds obtained were purified by flash chromatography on silica gel.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-methyl-1-(4-nitrobenzoyl)piperazine (10). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2.5:1) as eluent (181 mg, 52% yield), mp 115–117 °C. MS (CI): m/z 350 (30%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.30–8.27 (m, 2H), 7.68–7.65 (m, 2H), 3.95–3.88 (m, 1H), 3.79–3.73 (m, 2H), 3.13–3.09 (m, 2H), 2.95–2.88 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.18 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 168.3, 151.1, 141.9, 128.5, 124.3, 79.8, 51.1, 44.2, 39.4, 28.6, 15.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{23}N_3O_5$ 349.1637 $[M]^+$; found 349.1638. Anal. Calcd for $C_{17}H_{23}N_3O_5$: C, 58.44; H, 6.64; N, 12.03. Found: C, 58.62; H, 6.75; N, 11.84.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-(4-methoxybenzoyl)-2-methylpiperazine (11). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (4:1) as eluent (237 mg, 71% yield), mp 84–87 °C. MS (CI): m/z 335 (28%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.38–7.33 (m, 2H), 7.01–6.98 (m, 2H), 4.35–4.28 (m, 1H), 3.93–3.83 (m, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.78–3.73 (m, 1H), 2.91–2.84 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 160.8, 155.1, 129.2, 114.5, 79.8, 55.9, 48.0, 43.9, 32.4, 28.5, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{26}N_2O_4$ 334.1890 $[M]^+$; found 334.1893. Anal. Calcd for $C_{18}H_{26}N_2O_4$: C, 64.65; H, 7.84; N, 8.38. Found: C, 64.77; H, 7.42; N, 8.33.

2-Methyl-1-(4-nitrobenzoyl)-4-pivaloylpiperazine (15). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (173 mg, 52% yield), mp 143–145 °C. MS (CI): m/z 334 (70%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.30–8.27 (m, 2H), 7.69–7.66 (m, 2H), 4.38–4.13 (m, 3H), 3.93–3.67 (m, 1H), 3.12–3.03 (m, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.17 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 177.1, 168.1, 144.8, 143.0, 128.7, 124.3, 80.2, 51.1, 48.8, 45.4, 38.8, 28.7, 15.8.

HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}N_3O_4$ 334.1770 $[M + H]^+$; found 334.1767. Anal. Calcd for $C_{17}H_{23}N_3O_4$: C, 61.25; H, 6.95; N, 12.60. Found: C, 61.08; H, 7.01; N, 12.43.

1-(4-Methoxybenzoyl)-2-methyl-4-pivaloylpiperazine (16). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (194 mg, 61% yield), mp 96–97 °C. MS (CI): m/z 319 (35%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.38–7.35 (m, 2H), 7.01–6.99 (m, 2H), 4.41–4.31 (m, 1H), 4.23–4.12 (m, 2H), 3.92–3.85 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.09–2.99 (m, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 129.4, 114.3, 80.2, 55.8, 48.4, 45.7, 38.8, 28.7, 27.4, 15.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{27}N_2O_3$ 319.2016 $[M + H]^+$; found 319.2022. Anal. Calcd for $C_{18}H_{26}N_2O_3$: C, 67.90; H, 8.23; N, 8.80. Found: C, 67.55; H, 8.17; N, 8.49.

4-Benzoyl-2-methyl-1-(4-nitrobenzoyl)piperazine (20). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:2) as eluent (205 mg, 58% yield), mp 103–105 °C. MS (CI): m/z 354 (85%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.30–8.27 (m, 2H), 7.70–7.67 (m, 2H), 7.48–7.40 (m, 5H), 4.40–4.22 (m, 1H), 4.10–3.92 (m, 3H), 3.89–3.70 (m, 2H), 1.20 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 171.2, 156.8, 129.2, 114.5, 47.7, 15.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{19}H_{20}N_3O_4$ 354.1457 $[M + H]^+$; found 354.1454.

4-Benzoyl-1-(4-methoxybenzoyl)-2-methylpiperazine (21). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (3:1) as eluent (210 mg, 62% yield). MS (CI): m/z 339 (20%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.31–8.25 (m, 2H), 7.72–7.68 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 5H), 4.35–4.28 (m, 1H), 3.93–3.83 (m, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.78–3.73 (m, 1H), 2.91–2.84 (m, 2H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 171.2, 155.1, 136.4, 133.9, 129.9, 128.9, 127.3, 122.6, 114.5, 55.9, 48.0, 43.9, 32.4, 28.5, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{20}H_{23}N_2O_3$ 339.1709 $[M + H]^+$; found 339.1701.

General Procedure 3: Synthesis of the Urea/Thiourea Derivatives (12–14, 17–19, 22–41, 46–65). To a solution of the 1-monoacyl derivatives (6–9, 43–45) (1.0 mol) in dry dichloromethane (20 mL) was added the corresponding isocyanate or isothiocyanate (1.2 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature until TLC showed that all the starting material had reacted. The reaction mixture was evaporated to dryness. The compounds were purified by flash chromatography on silica gel using the appropriate eluent.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]piperazine (12). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (289 mg, 76% yield), mp 174–176 °C. MS (FAB): m/z 403 (95%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.42 (br s, 1H), 8.16–8.11 (m, 2H), 7.61–7.59 (m, 2H), 5.14–5.05 (m, 1H), 4.43–4.35 (m, 1H), 3.92–3.76 (m, 2H), 3.42–3.34 (m, 1H), 3.04–2.97 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.21 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 181.3, 154.5, 147.7, 142.4, 123.9, 123.2, 79.6, 51.8, 43.0, 27.9, 14.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}N_4O_4SNa$ 403.1410 $[M + Na]^+$; found 403.1405. Anal. Calcd $C_{17}H_{24}N_4O_4S$: C, 53.67; H, 6.36; N, 14.73; S, 8.43. Found: C, 53.60; H, 6.58; N, 14.56; S, 8.27.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]piperazine (13). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (266 mg, 73% yield), mp 165–167 °C. MS (FAB): m/z 387 (45%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.15–8.12 (m, 2H), 7.96–7.93 (m, 1H), 7.74–7.70 (m, 2H), 4.43–4.35 (m, 1H), 3.94–3.86 (m, 2H), 3.78–3.71 (m, 3H), 3.13–3.08 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.15 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 155.2, 154.3, 147.8, 142.1, 125.0, 119.3, 79.7, 55.1, 47.2, 43.7, 39.0, 28.6, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}N_4O_3Na$ 387.1639 $[M + Na]^+$; found 387.1631. Anal. Calcd $C_{17}H_{24}N_4O_3$: C, 56.03; H, 6.64; N, 15.38. Found: C, 55.99; H, 6.80; N, 15.28.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (14). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (168 mg, 48% yield), mp 184–186 °C. MS (CI): m/z 350

(10%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.01 (br s, 1H), 7.34–7.31 (m, 2H), 6.85–6.81 (m, 2H), 4.35–4.29 (m, 1H), 3.91–3.86 (m, 1H), 3.85–3.80 (m, 1H), 3.76–3.74 (m, 2H), 3.76–3.72 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.11 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 156.0, 155.5, 134.0, 122.7, 116.8, 114.3, 79.5, 55.8, 46.7, 43.8, 38.7, 28.6, 15.4. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{27}N_3O_4$ 349.2005 $[M]^+$; found 349.2002. Anal. Calcd $C_{18}H_{27}N_3O_4$: C, 61.87; H, 7.79; N, 12.03. Found: C, 61.60; H, 7.82; N, 11.99.

2-Methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminothiocarbonyl]-4-pivaloylpiperazine (17). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (222 mg, 61% yield), mp 168–170 °C. MS (FAB): m/z 387 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.77 (br s, 1H), 8.17–8.11 (m, 2H), 7.63–7.58 (m, 2H), 5.15–5.05 (m, 1H), 4.47–4.38 (m, 1H), 4.23–4.11 (m, 2H), 3.23–3.10 (m, 3H), 1.25 (s, 9H), 1.1 (d, J = 6.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 182.3, 124.3, 122.5, 53.5, 48.7, 45.1, 43.5, 40.5, 28.6, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}N_4O_3SNa$ 387.1461 $[M + Na]^+$; found 387.1455. Anal. Calcd for $C_{17}H_{24}N_4O_3S$: C, 56.02; H, 6.64; N, 15.37; S, 8.80. Found: C, 55.83; H, 6.68; N, 15.07; S, 8.64.

2-Methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]-4-pivaloylpiperazine (18). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (237 mg, 68% yield), mp 220–222 °C. MS (CI): m/z 349 (18%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 (br s, 1H), 8.15–8.12 (m, 2H), 7.74–7.71 (m, 2H), 4.47–4.38 (m, 1H), 4.20–4.12 (m, 2H), 3.97–3.92 (m, 1H), 3.14–3.06 (m, 3H), 1.26 (s, 9H), 1.14 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.9, 154.5, 147.8, 141.9, 125.2, 119.1, 80.2, 51.1, 48.3, 47.7, 45.4, 39.4, 28.6, 15.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{23}N_4O_4$ 349.1866 $[M + H]^+$; found 349.1876. Anal. Calcd $C_{17}H_{23}N_4O_4$: C, 58.61; H, 6.94; N, 16.08. Found: C, 58.44; H, 6.98; N, 16.02.

1-[(4-Methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-methyl-4-pivaloylpiperazine (19). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:2) as eluent (197 mg, 59% yield), mp 171–173 °C. MS (CI): m/z 334 (12%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.11 (br s, 1H), 8.15–8.12 (m, 2H), 7.35–7.32 (m, 2H), 6.85–7.82 (m, 2H), 4.40–4.32 (m, 1H), 4.18–4.05 (m, 2H), 3.91–3.86 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.13–3.03 (m, 3H), 1.26 (s, 9H), 1.10 (d, J = 6.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 177.7, 155.7, 134.0, 122.7, 121.0, 114.3, 79.8, 55.9, 48.5, 47.4, 45.6, 39.1, 28.7, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{27}N_3O_3$ 333.2056 $[M]^+$; found 333.2052. Anal. Calcd $C_{18}H_{27}N_3O_3$: C, 64.84; H, 8.16; N, 12.60. Found: C, 64.67; H, 8.05; N, 12.33.

4-Benzoyl-2-methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminothiocarbonyl]piperazine (22). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (250 mg, 65% yield). MS (CI): m/z 385 (30%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.22–8.14 (m, 2H), 7.95–7.92 (m, 1H), 7.64–7.41 (m, 2H), 7.50–7.44 (m, 5H), 6.66–6.64 (m, 1H), 6.41 (br s, 1H), 5.16 (bs, 1H), 4.47–4.45 (m, 1H), 4.08–4.02 (m, 2H), 3.50–3.38 (m, 2H), 2.86–2.65 (m, 1H), 1.25 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 182.7, 155.3, 148.3, 143.2, 136.1, 128.9, 127.4, 126.6, 124.2, 123.6, 55.1, 43.6, 40.7, 40.5, 15.5. Anal. Calcd for $C_{19}H_{20}N_4O_3S$: C, 59.36; H, 5.24; N, 14.57; S, 8.34. Found: C, 59.19; H, 4.96; N, 14.35; S, 8.57.

4-Benzoyl-2-methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]piperazine (23). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:3) as eluent (339 mg, 92% yield), mp 208–210 °C. MS (CI): m/z 369 (20%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (br s, 1H), 8.15–8.12 (m, 2H), 7.74–7.70 (m, 2H), 7.49–7.42 (m, 5H), 4.47–4.44 (m, 1H), 4.06–3.80 (m, 2H), 1.17 (d, J = 6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166.0, 154.5, 147.6, 130.4, 128.9, 127.4, 126.6, 124.4, 119.3, 113.1, 47.7, 39.2, 15.6. HRMS (m/z): calcd for $C_{19}H_{21}N_4O_4$ 369.1556 $[M + H]^+$; found 369.1563. Anal. Calcd for $C_{19}H_{20}N_4O_4$: C, 61.95; H, 5.47; N, 15.21. Found: C, 61.78; H, 5.57; N, 15.33.

4-Benzoyl-1-[(4-methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (24). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:2) as eluent

(251 mg, 71% yield), mp 171–173 °C. MS (CI): m/z 354 (15%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (br s, 1H), 7.49–7.31 (m, 6H), 6.84–6.82 (m, 2H), 4.38 (m, 1H), 3.91–3.87 (m, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.31–3.23 (m, 2H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.8, 155.8, 136.4, 133.9, 129.9, 128.9, 127.3, 122.6, 114.3, 79.5, 55.9, 47.1, 38.8, 28.6, 15.5. HRMS (m/z): calcd for $C_{20}H_{23}N_3O_3$ 353.1737 $[M]^+$; found 353.1739. Anal. Calcd for $C_{20}H_{23}N_3O_3$: C, 67.97; H, 6.56; N, 11.89. Found: C, 67.72; H, 6.63; N, 11.82.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-2-methyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]piperazine (25). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (241 mg, 59% yield), mp 99–101 °C. MS (FAB): m/z 431 (40%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.23 (s, 1H), 8.2–7.7 (m, 9H), 4.47 (s, 1H), 4.34 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.4–4.3 (m, 2H), 3.3–3.2 (m, 2H), 1.16 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8, 154.1, 153.9, 147.0, 141.1, 126.8, 126.5, 125.1, 124.6, 123.8, 122.6, 118.8, 111.8, 111.4, 59.9, 46.9, 15.4. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}N_4O_5Na$ 431.1326 $[M + Na]^+$; found 431.1316. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}N_4O_5$: C, 61.76; H, 4.94; N, 13.72. Found: C, 62.03; H, 5.06; N, 13.39.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (26). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (3:1) as eluent (330 mg, 84% yield), mp 170–172 °C. MS (FAB): m/z 416 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.39 (s, 1H), 7.8–6.8 (m, 9H), 4.4–4.3 (m, 3H), 4.18 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.20 (t, J = 2.8 Hz, J = 11.2 Hz, 2H), 1.13 (d, J = 6.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155.9, 155.3, 154.5, 148.3, 133.3, 127.3, 127.1, 124.4, 123.1, 122.9, 120.9, 114.1, 112.3, 111.9, 55.7, 55.6, 47.2, 15.4. HRMS (m/z): calcd for $C_{22}H_{23}N_3O_4Na$ 416.1581 $[M + Na]^+$; found 416.1576. Anal. Calcd $C_{22}H_{23}N_3O_4$: C, 67.16; H, 5.89; N, 10.68. Found: C, 67.18; H, 5.75; N, 10.62.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-chlorophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (27). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (247 mg, 70% yield), mp 174–176 °C. MS (FAB): m/z 376 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (s, 1H), 7.41 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 4.29 (br s, 1H), 3.02 (dt, J = 3.6 Hz, J = 12.9 Hz, 2H), 2.84 (br s, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.09 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 154.5, 139.0, 128.2, 125.8, 121.6, 79.4, 46.4, 27.9, 14.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}ClN_3O_3Na$ 376.1398 $[M + Na]^+$; found 376.1389. Anal. Calcd $C_{17}H_{24}ClN_3O_3$: C, 57.70; H, 6.84; N, 11.88. Found: C, 57.79; H, 6.58; N, 11.70.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-methyl-1-[(4-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]piperazine (28). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (221 mg, 57% yield), mp 187–189 °C. MS (FAB): m/z 410 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.30 (br s, 1H), 3.05 (dt, J = 3.6 Hz, J = 12.8 Hz, 2H), 2.84 (br s, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.08 (d, J = 6.8 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155.2, 155.1, 144.5, 126.1, 123.9, 119.9, 80.0, 47.1, 28.5, 15.3. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{24}F_3N_3O_3Na$ 410.1662 $[M + Na]^+$; found 410.1652. Anal. Calcd $C_{18}H_{24}F_3N_3O_3$: C, 55.81; H, 6.24; N, 10.85. Found: C, 56.03; H, 6.27; N, 10.76.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-methyl-1-[(2-nitrophenyl)aminocarbonyl]piperazine (29). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (345 mg, 95% yield), mp 199–201 °C. MS (FAB): m/z 387 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29 (br s, 1H), 7.97–7.95 (m, 1H), 7.71–7.64 (m, 2H), 7.25–7.21 (m, 1H), 4.29 (br s, 1H), 3.94 (br s, 1H), 3.85–3.77 (m, 2H), 2.84 (br s, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.15 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155.2, 155.2, 134.6, 134.0, 125.0, 123.8, 122.9, 119.1, 79.0, 46.9, 38.3, 28.0, 15.0. HRMS (m/z): calcd for $C_{17}H_{24}N_4O_5Na$ 387.1639 $[M + Na]^+$; found 387.1628. Anal. Calcd $C_{17}H_{24}N_4O_5$: C, 56.03; H, 6.64; N, 15.38. Found: C, 56.13; H, 6.42; N, 15.47.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(2-chloro-5-trifluoromethylphenyl)-aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (30). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (7.5:1) as eluent (396 mg, 94% yield), mp 98–100 °C. MS (FAB): m/z 444 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (br s, 1H), 7.94–7.93 (m, 1H), 7.73–7.71 (m, 2H), 7.51–7.49 (m, 1H), 4.33 (br s, 1H), 3.92 (br s, 1H), 3.86–3.76 (m, 2H), 3.12–3.07 (m, 2H), 2.90 (br s, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.15 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.4, 154.3, 137.6, 131.6, 130.4, 127.7, 122.4, 121.6, 79.0, 46.8, 38.3, 28.0, 14.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{23}ClF_3N_3O_3Na$ 444.1272 $[M + Na]^+$; found 444.1259. Anal. Calcd $C_{18}H_{23}ClF_3N_3O_3$: C, 51.25; H, 5.50; N, 9.96. Found: C, 51.47; H, 5.64; N, 9.72.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (31). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (404 mg, 96% yield), mp 157–159 °C. MS (FAB): m/z 444 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.91 (br s, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.81–7.79 (m, 2H), 7.59–7.57 (m, 1H), 4.36 (br s, 1H), 4.00–3.75 (m, 3H), 3.10–3.04 (m, 2H), 2.87 (br s, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.11 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.2, 140.2, 131.6, 130.4, 126.2, 124.0, 122.2, 118.0, 79.0, 46.4, 38.2, 28.2, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{18}H_{23}ClF_3N_3O_3Na$ 444.1272 $[M + Na]^+$; found 444.1267. Anal. Calcd $C_{18}H_{23}ClF_3N_3O_3$: C, 51.25; H, 5.50; N, 9.96. Found: C, 51.33; H, 5.29; N, 9.63.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-chlorophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (32). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (334 mg, 84% yield), mp 97–99 °C. MS (FAB): m/z 420 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.65 (s, 1H), 7.7–7.3 (m, 9H), 4.43 (s, 1H), 4.32 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.19 (m, 2H), 3.3–3.2 (m, 2H), 1.14 (d, J = 6.6 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8, 154.7, 153.9, 147.7, 139.0, 128.2, 126.8, 126.5, 125.9, 123.8, 122.6, 121.6, 111.8, 111.4, 59.5, 48.7, 46.7, 26.7, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}ClN_3O_3Na$ 420.1085 $[M + Na]^+$; found 420.1079. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}ClN_3O_3$: C, 63.40; H, 5.07; N, 10.56. Found: C, 63.79; H, 5.13; N, 10.22.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]piperazine (33). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (267 mg, 62% yield), mp 93–95 °C. MS (FAB): m/z 454 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.91 (s, 1H), 7.8–7.3 (m, 9H), 4.45 (br s, 1H), 4.33 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 4.20 (m, 2H), 3.3–3.2 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 154.5, 153.9, 147.7, 143.9, 126.8, 126.8, 126.5, 125.6, 125.5, 123.8, 122.6, 119.4, 111.8, 111.4, 54, 48.7, 46.8, 26.7, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{22}H_{20}F_3N_3O_3Na$ 454.1349 $[M + Na]^+$; found 454.1340. Anal. Calcd $C_{22}H_{20}F_3N_3O_3$: C, 61.25; H, 4.67; N, 9.74. Found: C, 61.49; H, 4.90; N, 9.43.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-cyanophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (34). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:2) as eluent (367 mg, 95% yield), mp 97–99 °C. MS (FAB): m/z 411 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02 (s, 1H), 7.7–7.3 (m, 9H), 4.42 (br s, 1H), 4.30 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.10 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.23 (t, J = 11.5 Hz, 2H), 1.12 (d, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 154.2, 153.9, 144.8, 132.8, 126.8, 126.5, 125.6, 123.8, 122.6, 119.4, 118.6, 113.6, 111.7, 111.4, 103.3, 59.9, 46.8, 15.0. HRMS (m/z): calcd for $C_{22}H_{20}N_4O_3Na$ 411.1428 $[M + Na]^+$; found 411.1418. Anal. Calcd $C_{22}H_{20}N_4O_3$: C, 68.03; H, 5.19; N, 14.42. Found: C, 68.17; H, 5.10; N, 14.75.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-fluorophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (35). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (320 mg, 84% yield), mp 93–95 °C. MS (FAB): m/z 404 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.59 (s, 1H), 7.78–7.05 (m, 9H), 4.42 (br s, 2H), 4.33–4.27 (m, 2H), 4.23–4.13 (m, 1H), 3.24–3.19 (m, 2H), 1.14 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125

MHz, DMSO- d_6) δ 158.6, 155.1, 153.9, 147.7, 136.15, 136.13, 126.8, 126.5, 123.8, 122.6, 122.2, 122.1, 114.9, 114.7, 46.7, 26.7, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}FN_3O_3Na$ 404.1381 $[M + Na]^+$; found 404.1369. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}FN_3O_3$: C, 66.13; H, 5.29; N, 11.02. Found: C, 66.07; H, 5.59; N, 11.19.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-2-methyl-1-[(2-nitrophenyl)-aminocarbonyl]piperazine (36). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (294 mg, 95% yield), mp 141–143 °C. MS (FAB): m/z 431 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.37 (s, 1H), 7.94–7.22 (m, 9H), 4.39–4.29 (m, 2H), 4.22–4.14 (d, 2H), 3.51–3.39 (m, 1H), 3.35–3.20 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 154.3, 153.9, 147.6, 140.8, 134.14, 134.11, 126.8, 126.5, 125.0, 123.9, 123.8, 123.4, 122.6, 111.7, 111.5, 47.3, 15.1. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}N_4O_5Na$ 431.1326 $[M + Na]^+$; found 431.1319. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}N_4O_5$: C, 61.76; H, 4.94; N, 13.72. Found: C, 62.05; H, 5.07; N, 13.41.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2-fluorophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (37). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (267 mg, 70% yield), mp 127–129 °C. MS (FAB): m/z 404 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.38 (s, 1H), 7.78–7.10 (m, 9H), 4.40 (br s, 1H), 4.34–4.32 (m, 1H), 4.18–4.11 (m, 2H), 3.25–3.21 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 155.2, 154.0, 147.7, 127.0, 126.8, 126.5, 125.6, 125.5, 124.0, 123.8, 122.6, 115.6, 111.7, 47.0, 14.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}FN_3O_3Na$ 404.1381 $[M + Na]^+$; found 404.1372. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}FN_3O_3$: C, 66.13; H, 5.29; N, 11.02. Found: C, 66.25; H, 5.60; N, 10.85.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2-bromophenyl)aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (38). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (380 mg, 86% yield), mp 129–131 °C. MS (FAB): m/z 464 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.25 (s, 1H), 7.78–7.08 (m, 9H), 4.40 (br s, 1H), 4.33–4.32 (m, 1H), 4.20–4.17 (m, 1H), 3.27–3.22 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 155.1, 153.9, 147.7, 137.5, 132.4, 128.0, 127.6, 126.8, 126.6, 123.8, 122.6, 119.8, 111.7, 78.8, 47.1, 15.0. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{20}BrN_3O_3Na$ 464.0580 $[M + Na]^+$; found 464.0574. Anal. Calcd $C_{21}H_{20}BrN_3O_3$: C, 57.02; H, 4.56; N, 9.50. Found: C, 57.16; H, 4.49; N, 9.40.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2,4-difluorophenyl)-aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (39). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (323 mg, 81% yield), mp 163–165 °C. MS (FAB): m/z 422 (100%) $[M + H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.40 (s, 1H), 7.78–7.00 (m, 8H), 4.38 (br s, 1H), 4.33–4.31 (m, 1H), 4.20–4.18 (m, 1H), 3.24–3.20 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.9, 155.3, 154.0, 147.7, 128.1, 128.0, 126.8, 126.5, 123.8, 122.6, 111.7, 111.4, 47.0, 14.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{21}H_{19}F_2N_3O_3Na$ 422.1287 $[M + Na]^+$; found 422.1275. Anal. Calcd $C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$: C, 63.15; H, 4.80; N, 10.52. Found: C, 63.35; H, 4.97; N, 10.06.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2-methoxyphenyl)-aminocarbonyl]-2-methylpiperazine (40). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (373 mg, 95% yield), mp 127–129 °C. MS (FAB): m/z 416 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.15 (s, 1H), 7.78–7.00 (m, 9H), 4.38 (br s, 1H), 4.32–4.30 (m, 1H), 4.20–4.15 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.26–3.22 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160.0, 155.0, 154.0, 147.7, 128.0, 126.8, 126.5, 123.8, 122.7, 120.2, 111.8, 111.0, 55.7, 47.0, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $C_{22}H_{23}N_3O_4Na$ 416.1581 $[M + Na]^+$; found 416.1568. Anal. Calcd $C_{22}H_{23}N_3O_4$: C, 67.16; H, 5.89; N, 10.68. Found: C, 67.34; H, 6.08; N, 10.49.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-2-methyl-1-(phenylaminocarbonyl)-piperazine (41). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (352 mg, 97% yield), mp 138–140 °C. MS (FAB): m/z 386 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.54 (s, 1H), 7.78–

7.00 (m, 10H), 4.44 (br s, 1H), 4.34–4.31 (m, 1H), 4.25–4.07 (m, 2H), 3.24–3.17 (m, 2H), 1.14 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155.2, 154.0, 140.0, 128.4, 126.8, 126.5, 123.8, 122.6, 122.3, 120.2, 111.8, 111.4, 78.8, 46.7, 14.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 386.1475 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 386.1463. Anal. Calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 69.41; H, 5.82; N, 11.56. Found: C, 69.62; H, 5.95; N, 11.33.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (46). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (213 mg, 50% yield), mp 101–103 °C. MS (FAB): m/z 449 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.0–7.3 (m, 9H), 6.65 (m, 1H), 5.1 (m, 1H), 4.5–3.3 (m, 6H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.3, 144.9, 142.7, 138.3, 129.7, 126.4, 125.0, 118.4, 80.5, 28.3. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ 449.1796 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 449.1781. Anal. Calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 61.96; H, 6.15; N, 13.14. Found: C, 62.15; H, 6.19; N, 12.91.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-chlorophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (47). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (407 mg, 98% yield), mp 115–117 °C. MS (FAB): m/z 438 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.77 (s, 1H), 7.53–7.50 (m, 2H), 7.39–7.35 (m, 2H), 7.32–7.26 (m, 5H), 5.47 (s, 1H), 4.45 (br s, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.89–3.57 (m, 1H), 3.15–3.03 (m, 2H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.9, 139.4, 131.6, 128.4, 128.2, 126.9, 126.4, 125.5, 121.2, 79.1, 53.1, 27.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{Na}$ 438.1555 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 438.1542. Anal. Calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_3$: C, 63.53; H, 6.30; N, 10.10. Found: C, 63.17; H, 6.20; N, 9.73.

4-tert-Butoxycarbonyl-2-phenyl-1-[(4-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]piperazine (48). The product was obtained as a syrup and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (3:1) as eluent (202 mg, 45% yield). MS (FAB): m/z 472 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.5–7.2 (m, 9H), 6.50 (s, 1H), 5.1 (m, 1H), 4.5–3.1 (m, 6H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.8, 154.4, 142.0, 138.4, 129.6, 128.6, 123.1, 119.1, 114.2, 80.4, 58.1, 46.5, 44.1, 39.4, 28.4. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 472.1818 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 472.1803.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-fluorophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (49). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (3:1) as eluent (315 mg, 79% yield), mp 202–204 °C. MS (FAB): m/z 422 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (s, 1H), 7.5–7.1 (m, 9H), 5.47 (s, 1H), 4.45 (br s, 1H), 4.05–3.97 (m, 1H), 3.87–3.71 (m, 1H), 3.14–2.93 (m, 2H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 158.4, 156.5, 136.6, 128.4, 126.6, 121.6, 121.5, 114.9, 114.7, 79.1, 53.1, 27.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_3\text{Na}$ 422.1850 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 422.1838. Anal. Calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_3$: C, 66.15; H, 6.56; N, 10.52. Found: C, 66.21; H, 6.46; N, 10.22.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-cyanophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (50). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (390 mg, 96% yield), mp 94–96 °C. MS (FAB): m/z 429 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.5–7.2 (m, 9H), 6.55 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.5–3.2 (m, 6H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.4, 142.7, 138.3, 133.1, 129.7, 126.2, 119.1, 114.5, 105.8, 80.5, 28.3. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ 429.1897 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 429.1897. Anal. Calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$: C, 67.96; H, 6.45; N, 13.78. Found: C, 68.03; H, 6.37; N, 13.27.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(2-nitrophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (51). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (384 mg, 90% yield), mp 132–134 °C. MS (FAB): m/z 449 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.41 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.67 (dt, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.38 (m, 4H), 7.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.24 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.45 (br s, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.88–3.67 (m, 1H), 3.47–3.40 (m, 1H), 3.24–

2.94 (m, 2H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.5, 140.6, 134.4, 134.1, 128.4, 127.0, 126.6, 125.50, 123.9, 123.1, 79.1, 27.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ 449.1795 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 449.1782. Anal. Calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 61.96; H, 6.15; N, 13.14. Found: C, 61.98; H, 5.88; N, 12.97.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(2-chloro-5-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (52). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (9:1) as eluent (473 mg, 98% yield), mp 96–98 °C. MS (FAB): m/z 506 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.39 (s, 1H), 8.03–7.31 (m, 8H), 5.41 (s, 1H), 4.44–4.20 (m, 1H), 4.05–3.99 (m, 1H), 3.88–3.66 (m, 1H), 3.56–3.47 (m, 1H), 3.31–3.23 (m, 1H), 1.33 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.7, 140.1, 131.6, 128.4, 126.6, 124.0, 122.3, 118.0, 79.1, 54.0, 27.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 506.1429 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 506.1417. Anal. Calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3$: C, 57.09; H, 5.21; N, 8.68. Found: C, 57.04; H, 5.34; N, 8.46.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (53). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (5:1) as eluent (464 mg, 96% yield), mp 109–111 °C. MS (FAB): m/z 506 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.01 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.41–7.35 (m, 2H), 7.32–7.27 (m, 3H), 5.48 (s, 1H), 4.47 (br s, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.89–3.63 (m, 1H), 3.44–3.37 (m, 1H), 3.15–2.91 (m, 2H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154.6, 137.5, 130.5, 128.5, 126.6, 121.5, 79.1, 54.1, 27.9. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 506.1429 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 506.1418. Anal. Calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3$: C, 57.09; H, 5.21; N, 8.68. Found: C, 56.85; H, 5.27; N, 8.49.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (54). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (370 mg, 90% yield), mp 90–92 °C. MS (FAB): m/z 434 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.4–7.3 (m, 9H), 6.08 (s, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.3–3.4 (m, 6H), 3.75 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.0, 155.7, 138.9, 131.7, 129.4, 128.5, 126.5, 123.7, 122.2, 114.1, 80.2, 58.0, 55.5, 49.4, 45.2, 39.4, 28.3. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ 434.2050 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 434.2037. Anal. Calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 67.13; H, 7.10; N, 10.21. Found: C, 67.32; H, 6.93; N, 9.98.

4-tert-Butoxycarbonyl-1-[(4-methylphenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (55). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (3:1) as eluent (348 mg, 88% yield), mp 162–164 °C. MS (FAB): m/z 418 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.4–7.3 (m, 9H), 6.15 (s, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.4–3.3 (m, 6H), 2.25 (s, 3H), 1.33 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 150.2, 133.6, 130.8, 127.6, 124.1, 114.9, 75.0, 23.1, 15.5. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 418.2101 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 418.2088. Anal. Calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 69.85; H, 7.39; N, 10.62. Found: C, 70.03; H, 7.55; N, 10.42.

1-[(4-Nitrophenyl)aminocarbonyl]-2-phenyl-4-pivaloylpiperazine (56). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1.5:1) as eluent (352 mg, 97% yield). MS (FAB): m/z 433 (65%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.31 (s, 1H), 8.22–7.23 (m, 9H), 5.42 (m, 1H), 1.10 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 175.4, 156.2, 152.3, 145.1, 132.5, 128.6, 125.6, 122.2, 120.5, 113.8, 60.3, 55.7, 52.3, 46.5, 46.1, 45.2, 38.1, 28.7. HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ 433.1852 [$M + \text{Na}$] $^+$; found 433.1833. Anal. Calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$: C, 64.37; H, 6.38; N, 13.65. Found: C, 64.58; H, 6.19; N, 13.51.

1-[(4-Cyanophenyl)aminocarbonyl]-2-phenyl-4-pivaloylpiperazine (57). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (261 mg, 67% yield), mp 151–153 °C. MS (FAB): m/z 413 (100%) [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (s, 1H), 7.3–6.8 (m, 9H), 5.42 (m, 1H), 4.56 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 3.98 (td, $J = 3.4$ Hz, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.98 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.45 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.08 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.0, 154.7, 139.7, 132.7, 128.3, 126.3, 121.9, 120.2,

113.8, 113.5, 79.0, 55.2, 55.1, 45.4, 38.1, 27.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{23}H_{26}N_4O_2Na$ 413.1948 $[M + Na]^+$; found 413.1933. Anal. Calcd $C_{23}H_{26}N_4O_2$: C, 70.75; H, 6.71; N, 14.35. Found: C, 70.87; H, 6.46; N, 14.64.

1-[(4-Methoxyphenyl)aminocarbonyl]-2-phenyl-4-pivaloylpiperazine (58). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (229 mg, 58% yield), mp 62–65 °C. MS (FAB): m/z 418 (55%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (s, 1H), 7.3–6.8 (m, 9H), 5.42 (m, 1H), 4.56 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.98 (td, J = 3.4 Hz, J = 13.0 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.45 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.08 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.0, 154.7, 139.7, 132.7, 128.3, 126.3, 121.9, 120.2, 113.8, 113.5, 79.0, 55.2, 55.1, 45.4, 38.1, 27.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{23}H_{29}N_3O_3Na$ 418.2101 $[M + Na]^+$; found 418.2088. Anal. Calcd $C_{23}H_{29}N_3O_3$: C, 69.85; H, 7.39; N, 10.62. Found: C, 69.95; H, 7.55; N, 10.37.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-nitrophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (59). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (400 mg, 85% yield), mp 141–143 °C. MS (FAB): m/z 493 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.39 (s, 1H), 8.16 (m, 2H), 7.76–7.71 (m, 3H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.39–7.20 (m, 7H), 5.62 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.76–3.42 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 154.3, 153.9, 147.9, 147.2, 145.7, 141.5, 14.1, 138.9, 128.5, 127.1, 126.7, 126.3, 125.1, 124.7, 123.7, 122.5, 118.6, 111.8, 54.1, 48.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{26}H_{22}N_4O_5Na$ 493.1482 $[M + Na]^+$; found 493.1470. Anal. Calcd $C_{26}H_{22}N_4O_5$: C, 66.37; H, 4.71; N, 11.91. Found: C, 66.58; H, 4.93; N, 11.71.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-chlorophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (60). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (414 mg, 90% yield), mp 118–120 °C. MS (FAB): m/z 482 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.82 (s, 1H), 7.76–7.26 (m, 14H), 5.59 (br s, 1H), 4.81 (br s, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.80–3.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 154.4, 153.9, 147.9, 139.3, 128.5, 128.2, 127.0, 126.7, 126.3, 125.6, 123.7, 122.5, 121.2, 111.8, 36.2, 28.2. HRMS (m/z): calcd for $C_{26}H_{22}ClN_3O_3Na$ 482.1242 $[M + Na]^+$; found 482.1237. Anal. Calcd $C_{26}H_{22}ClN_3O_3$: C, 67.90; H, 4.82; N, 9.14. Found: C, 68.15; H, 5.01; N, 8.93.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]piperazine (61). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (468 mg, 95% yield), mp 134–136 °C. MS (FAB): m/z 516 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 1H), 7.77–7.26 (m, 14H), 5.63 (br s, 1H), 4.81 (br s, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.79–3.49 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 154.7, 153.9, 147.9, 144.1, 139.0, 128.5, 127.1, 126.7, 126.3, 125.6, 123.7, 122.5, 119.1, 111.8, 53.9, 48.7. HRMS (m/z): calcd for $C_{27}H_{22}F_3N_3O_3Na$ 516.1505 $[M + Na]^+$; found 516.1494. Anal. Calcd $C_{27}H_{22}F_3N_3O_3$: C, 65.72; H, 4.49; N, 8.52. Found: C, 65.51; H, 4.18; N, 8.82.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-fluorophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (62). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (337 mg, 76% yield), mp 122–124 °C. MS (FAB): m/z 466 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (s, 1H), 7.78–7.10 (m, 14H), 5.61 (br s, 1H), 4.81 (br s, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.78–3.48 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 158.4, 156.6, 155.1, 153.9, 147.9, 139.2, 136.6, 128.5, 127.0, 126.6, 126.3, 123.7, 122.5, 121.6, 114.9, 111.7, 53.7, 30.6, 26.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{26}H_{22}FN_3O_3Na$ 466.1537 $[M + Na]^+$; found 466.1524. Anal. Calcd $C_{26}H_{22}FN_3O_3$: C, 70.42; H, 5.00; N, 9.48. Found: C, 70.22; H, 5.38; N, 9.19.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(4-cyanophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (63). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (1:1) as eluent (437 mg, 97% yield), mp 212–214 °C. MS (FAB): m/z 473

(100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.19 (s, 1H), 7.78–7.63 (m, 6H), 7.49–7.22 (m, 8H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.39–7.20 (m, 7H), 5.62 (br s, 1H), 4.81 (br s, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.77–3.44 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 154.4, 153.9, 147.9, 144.9, 139.0, 132.9, 128.5, 127.1, 126.7, 126.3, 125.1, 124.7, 123.7, 122.5, 119.2, 118.4, 111.8, 103.3, 53.8, 40.7, 36.2. HRMS (m/z): calcd for $C_{27}H_{22}N_4O_3Na$ 473.1584 $[M + Na]^+$; found 473.1569. Anal. Calcd $C_{27}H_{22}N_4O_3$: C, 71.99; H, 4.92; N, 12.44. Found: C, 71.88; H, 5.15; N, 12.21.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2-nitrophenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (64). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2:1) as eluent (348 mg, 74% yield), mp 143–145 °C. MS (FAB): m/z 493 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.45 (s, 1H), 7.98 (dd, J = 1.2 Hz, J = 8.4 Hz, 1H), 7.8 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.69–7.66 (m, 2H), 7.50–7.23 (m, 9H), 5.23 (br s, 1H), 4.77 (br s, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.84–3.41 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 154.4, 153.9, 147.9, 138.6, 134.4, 134.2, 128.5, 127.2, 126.7, 126.3, 125.1, 123.7, 123.1, 122.5, 111.7, 48.7, 26.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{26}H_{22}N_4O_5Na$ 493.1482 $[M + Na]^+$; found 493.1470. Anal. Calcd $C_{26}H_{22}N_4O_5$: C, 66.37; H, 4.71; N, 11.91. Found: C, 66.27; H, 4.83; N, 11.73.

4-(Benzofuran-2-carbonyl)-1-[(2-chloro-5-trifluoromethylphenyl)aminocarbonyl]-2-phenylpiperazine (65). The product was obtained as a solid and purified by column chromatography using hexane–ethyl acetate (2.5:1) as eluent (486 mg, 92% yield), mp 140–142 °C. MS (FAB): m/z 550 (100%) $[M + Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.70–7.66 (m, 2H), 7.49–7.44 (m, 3H), 7.40–7.29 (m, 7H), 5.53 (br s, 1H), 4.66 (br s, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.89–3.48 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.4, 154.5, 153.9, 147.9, 138.9, 137.4, 130.4, 128.6, 127.4, 126.7, 126.3, 124.8, 123.7, 122.5, 121.4, 111.8, 48.7, 26.8. HRMS (m/z): calcd for $C_{27}H_{21}ClF_3N_3O_3Na$ 550.1116 $[M + Na]^+$; found 550.1104. Anal. Calcd $C_{27}H_{21}ClF_3N_3O_3$: C, 61.43; H, 4.01; N, 7.96. Found: C, 61.00; H, 4.20; N, 7.73.

4.2. Biological Evaluation: Cells and Virus. Human A549, 293, and MRC-5 cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The 293 β 5 stable cell line overexpressing the human β 5 integrin subunit was generated by transfecting a cytomegalovirus promoter-driven expression plasmid containing the human β 5 gene into 293 cells and selecting for neomycin resistance.⁴¹ These cell lines were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies/Thermo Fisher) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Omega Scientific, Tarzana, CA), 10 mM HEPES, 4 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 0.1 mM nonessential amino acids (complete DMEM).

Wild-type HAdV5 and HAdV16 and HCMV (AD169) were obtained from ATCC. The HAdV5-GFP and HAdV16-GFP used in this work are replication-defective viruses containing a CMV promoter-driven enhanced green fluorescent protein (eGFP) reporter gene cassette in place of the E1/E3 regions.⁴² HAdV viruses were propagated in 293 β 5 cells and isolated from cellular lysate by cesium chloride density centrifugation. Virus concentration, in mg/mL, was calculated with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories) and converted to virus particles/mL (vp/mL) using 4×10^{12} vp/mg.

4.3. Entry Assay. An initial rapid screening was performed using human A549 epithelial cells (3×10^5 cells/well in Corning black wall, clear bottom 96-well plates) infected with HAdV5-GFP (2,000 vp/cell) in the presence of 50 μ M of the candidate antiviral compounds. Virus was preincubated with the compounds (individual and mixed) for 45 min at 4 °C, and then added to cells. A standard infection curve was generated in parallel by infecting cells in the absence of compounds using serial 2-fold dilutions of virus. All reactions were done in triplicate. Cells, virus, and compounds were incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. Infection, as measured by HAdV-mediated GFP expression, was analyzed using a Typhoon 9410 imager (GE Healthcare Life Sciences) and quantified with ImageQuantTL (GE Healthcare Life Sciences). Compounds that showed antiviral activity

were further tested in a dosage assay using 2000 vp/cell and compound concentrations ranging from 50 to 10 μ M.

4.4. Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity of the compounds was measured using the Alamar Blue cell viability assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Actively dividing A549 cells were incubated with compounds for 48 h. After the incubation the Alamar Blue reagent was added to the cells (1/10th Alamar Blue reagent in culture medium) for an extra 4 h. The 50% cell cytotoxic concentration (CC_{50}) of the molecules was calculated according to Cheng et al.⁴³ The selectivity index (SI) was evaluated as the ratio of CC_{50} to IC_{50} , where the IC_{50} is defined as the concentration of compound that inhibits HAdV infection by 50%.

4.5. Plaque Assay. For low MOI infections, active compounds were further evaluated in a plaque assay. 293B5 cells were seeded in 6-well plates at 4×10^5 cells per well in duplicate for each condition. When cells reached 80–90% confluency, they were infected with HAdV5-GFP or HAdV16-GFP (0.06 vp/cell) and rocked for 2 h at 37 °C. The inoculum was removed, and the cells were washed once with PBS. The cells were then carefully overlaid with 4 mL/well of equal parts of 1.6% (water/vol) Difco Agar Noble (Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD) and 2 \times EMEM (Minimum Essential Medium Eagle, BioWhittaker) supplemented with 2 \times penicillin/streptomycin, 2 \times L-glutamine, and 10% FBS. The mixture also contained compound in concentrations ranging from 5 to 1 μ M. Following incubation for 7 days at 37 °C, plates were scanned with a Typhoon 9410 imager (GE Healthcare Life Sciences) and plaques were quantified with ImageJ.⁴⁴ Compounds that showed antiviral activity were further tested in a dose–response assay using 0.06 vp/cell and compound concentrations ranging from 10 to 0.6 μ M for HAdV5-GFP and 10 to 1.25 μ M for HAdV5–16.

4.6. DNA Quantification by Real-Time PCR. For DNA quantification, A549 cells (150000 cells/well in a 24-well plate) were infected with wild-type HAdV5 or HAdV16 (100 vp/cell) and incubated for 2 h at 37 °C in complete DMEM. After the incubation, excess virus was removed and the medium was replaced with 500 μ L of complete DMEM containing 50 μ M of either compounds or the same volume of DMSO (positive control). All samples were done in triplicate. After 24 h of incubation at 37 °C, DNA was purified from the cell lysate with the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions. TaqMan primers and probes for a common region of the HAdV5 and HAdV16 hexons were designed with the GenScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design software (GenScript). Oligonucleotides sequences were AdF, 5'-GACATGACTTTTGAGGTGGA-3'; AdR, 5'-GTGGCG-TTGCCGCCGAGAA-3'; and AdProbe, 5'-TCCATGGGATCC-ACCTCAA-3'. Real-time PCR mixtures consisted of 2 μ L of the purified DNA, AdF, and AdR at a concentration of 200 nM each and AdProbe at a concentration of 50 nM in a total volume of 12.5 μ L and mixed with 12.5 μ L of KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPABiosystems, MA). The PCR cycling protocol was 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s.

Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as internal control. Oligonucleotides sequences for GAPDH and conditions were those previously reported by Rivera et al.⁴⁵ For quantification, gene fragments from hexon, and GAPDH were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and known concentrations of template were used to generate a standard curve in parallel for each experiment. All assays were performed in a C1000 thermal cycler apparatus (BioRad).

4.7. Nuclear-Associated HAdV Genomes. Nuclear delivery of the HAdV genome was assessed with real-time PCR following nuclear isolation from infected cells using a previously described protocol with a few modifications.⁴⁶ Briefly, 1×10^6 A549 cells in 6-well plates were infected with HAdV5 wild-type at MOI 2000 vp/cell in the presence of 50 μ M of compound or the same volume of DMSO. Forty-five min after the infection, cytoplasmic and nuclear fractions were separated using a hypotonic buffer solution and NP-40 detergent. Following infection, A549 cells were trypsinized and collected and then washed twice with PBS. The cell pellet was resuspended in 500 μ L of 1 \times hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM

MgCl₂) and incubated for 15 min at 4 °C. Then 25 μ L of NP-40 was added and the samples were vortexed. The homogenates were centrifuged for 10 min at 835g at 4 °C. Following removal of the cytoplasmic fraction (supernatant), DNA was isolated from the nuclear fraction (pellet) using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA).

4.8. Virus Yield Reduction. The effect of the active compounds on virus production was evaluated in a burst assay. A549 cells were infected with wild-type HAdV5 or HAdV16 (MOI 100) in the presence or absence of 50 μ M compounds. After 48 h, cells were harvested and subjected to three rounds of freeze/thaw. Serial dilutions of clarified lysates were titrated on A549 cells, and TCID₅₀ values were calculated using an end-point dilution method.⁴⁷

4.9. HCMV Infectivity Assay by Quantitative PCR. To test the sensitivity of HCMV to our compounds, MRC-5 cells (1.75×10^5 cells/well in a 6-well plate) were infected with HCMV at an MOI of 0.05 vp/cell and incubated in complete DMEM supplemented with 50 μ M of compound or the same volume of DMSO in triplicate. After 72 h of incubation at 37 °C, DNA was purified from the cell lysate with the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions. TaqMan primers and probes for a region of the US28 gene were designed with the GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design software (GenScript). Oligonucleotides sequences were: CMV-F, 5'-TCTACGTGGCTATGTTTGCC-3'; CMV-R, 5'-GGCCGATATCTCATGTAAACAA-3'; and CMV-Probe, 5'-CACGGAGATTGCACTCGATCGC-3'. Real-time PCR mixtures consisted of 10 μ L of the purified DNA, CMV-F at a concentration of 100 nM, CMV-R at a concentration of 300 nM, and CMV-Probe at a concentration of 50 nM in a total volume of 12.5 μ L and mixed with 12.5 μ L of KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPABiosystems, MA). The PCR cycling protocol was 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s and 58 °C for 60 s. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control. Oligonucleotides sequences for GAPDH, and conditions were those previously reported by Rivera et al.⁴⁵ For quantification, gene fragment from US28 and GAPDH were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), and known concentrations of template were used to generate a standard curve in parallel for each experiment. All assays were performed in a C1000 thermal cycler apparatus (BioRad).

4.10. Statistical Analyses. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5 suite. Unless otherwise indicated, data are presented as the mean of triplicate samples \pm standard deviation (SD).

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00300.

Copies of NMR spectra and dose–response graph of the inhibitory activity of the compounds (PDF)
Molecular formula strings (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*For J.S.-C.: phone, +34 955 923 100; E-mail, jsanchez-ibis@us.es.

*For F.I.-G.: phone, +34 954556737; E-mail, iglesias@us.es.

Author Contributions

J.S.C., P.M.A. and M.V.H. contributed equally to this work (joint first authors).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Perez-Romero (Institute of Biomedicine of Seville, Seville, Spain) for kindly providing the HCMV and the PCR system for its DNA quantification. This work has been supported by Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), cofinanced by European Development Regional Fund "A Way to Achieve Europe" ERDF, by the Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2013-49066-C2-2-R), and by Andalusia Health and Social Welfare Ministry (PI-0058-2012). J.S.C. is supported by the grant "Contract to Access to the Spanish System of Research and Innovation of the Program of R+D+i of the University of Seville" (USE-13901-D). P.M.A. is supported by a predoctoral contract PIF from the University of Seville (PP2011-2.1). A.S.G. and J.A.M.L. are supported by a grant from the Andalusian Public Foundation for the Management of Health Research in Seville (FISEVI). J.P. is full Professor of Medicine at University of Seville and Head of the Infectious Diseases Service at the University Hospital Virgen del Rocío. F.I.G. and J.M.V.P. are Full Professors of Organic and Medicinal Chemistry. M.V.H. and J.L.C.L. are Assistant Professor of Organic and Medicinal Chemistry. We also thank CITIUS (Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla) for its contribution in recording NMR and mass spectra.

■ ABBREVIATIONS USED

ATCC, American Type Culture Collection; CC_{50} , 50% cell cytotoxic concentration; COSY, correlation spectroscopy; DEPT, distortionless enhancement by polarization transfer; DMEM, Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; EMEM, Minimum Essential Medium Eagle; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphato dehydrogenase; HAdV, human adenovirus; HCMV, human cytomegalovirus; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HSCT, human stem cell transplant; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; IC_{50} , 50% inhibitory concentration; MOI, multiplicity of infection (viral particles/cell); NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; NP-40, nonyl phenoxypolyethoxylethanol; NPC1, endosomal membrane protein Niemann-PickC1; PCR, polymerase chain reaction; SD, standard deviation; SI, selectivity index; SOT, solid organ transplant; $TCID_{50}$, 50% tissue culture infective dose; TLC, thin layer chromatography

■ REFERENCES

- (1) Robinson, C. M.; Singh, G.; Lee, J. Y.; Dehghan, S.; Rajaiya, J.; Liu, E. B.; Yousuf, M. A.; Betensky, R. A.; Jones, M. S.; Dyer, D. W.; Seto, D.; Chodosh, J. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1812.
- (2) Echavarría, M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 704–715.
- (3) Tebruegge, M.; Curtis, N. Adenovirus: an overview for pediatric infectious diseases specialists. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2012**, *31*, 626–627.
- (4) Razonable, R. R.; Eid, A. J. Viral infections in transplant recipients. *Minerva Med.* **2009**, *100*, 479–501.
- (5) Verdeguer, A.; de Heredia, C. D.; Gonzalez, M.; Martinez, A. M.; Fernandez-Navarro, J. M.; Perez-Hurtado, J. M.; Badell, I.; Gomez, P.; Gonzalez, M. E.; Munoz, A.; Diaz, M. A. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant.* **2011**, *46*, 119–124.
- (6) Ison, M. G.; Green, M. Adenovirus in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2009**, *9* (Suppl 4), S161–S165.
- (7) Humar, A.; Kumar, D.; Mazzulli, T.; Razonable, R. R.; Moussa, G.; Paya, C. V.; Covington, E.; Alecock, E.; Pescovitz, M. D. A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 2555–2559.
- (8) Lenaerts, L.; De Clercq, E.; Naesens, L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* **2008**, *18*, 357–374.
- (9) Morfin, F.; Dupuis-Girod, S.; Frobert, E.; Mundweiler, S.; Carrington, D.; Sedlacek, P.; Bierings, M.; Cetkovsky, P.; Kroes, A. C.; van Tol, M. J.; Thouvenot, D. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antiviral Ther.* **2009**, *14*, 55–61.
- (10) Morfin, F.; Dupuis-Girod, S.; Mundweiler, S.; Falcon, D.; Carrington, D.; Sedlacek, P.; Bierings, M.; Cetkovsky, P.; Kroes, A. C.; van Tol, M. J.; Thouvenot, D. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antiviral Ther.* **2005**, *10*, 225–229.
- (11) Lindemans, C. A.; Leen, A. M.; Boelens, J. J. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* **2010**, *116*, 5476–5485.
- (12) Marketing authorisation for Vistide withdrawn. *Pharm. J.* **2014**, *293*, 7828, DOI: 10.1211/PJ.2014.20066406.
- (13) Paolino, K.; Sande, J.; Perez, E.; Loechelt, B.; Jantusch, B.; Painter, W.; Anderson, M.; Tiffin, T.; Lanier, E. R.; Fry, T.; DeBiasi, R. L. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 167–170.
- (14) Toth, K.; Spencer, J. F.; Dhar, D.; Sagartz, J. E.; Buller, R. M.; Painter, G. R.; Wold, W. S. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7293–7297.
- (15) Andersson, E. K.; Strand, M.; Edlund, K.; Lindman, K.; Enquist, P. A.; Spjut, S.; Allard, A.; Eloffsson, M.; Mei, Y. F.; Wadell, G. Smallmolecule screening using a whole-cell viral replication reporter gene assay identifies 2-[[2-(benzoylamino)benzoyl]amino]-benzoic acid as a novel antiadenoviral compound. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3871–3877.
- (16) Öberg, C. T.; Strand, M.; Andersson, E. K.; Edlund, K.; Tran, N. P. N.; Mei, Y.-F.; Wadell, G.; Eloffsson, M. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of 2-[[2-(benzoylamino)benzoylamino]benzoic acid analogues as inhibitors of adenovirus replication. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3170–3181.
- (17) Cianci, C.; Langley, D. R.; Dischino, D. D.; Sun, Y.; Yu, K. L.; Stanley, A.; Roach, J.; Li, Z.; Dalterio, R.; Colonna, R.; Meanwell, N. A.; Krystal, M. Targeting a binding pocket within the trimer-of-hairpins: small-molecule inhibition of viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15046–15051.
- (18) Frey, G.; Rits-Volloch, S.; Zhang, X. Q.; Schooley, R. T.; Chen, B.; Harrison, S. C. Small molecules that bind the inner core of gp41 and inhibit HIV envelope-mediated fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13938–13943.
- (19) Este, J. A.; Telenti, A. HIV entry inhibitors. *Lancet* **2007**, *370*, 81–88.
- (20) Plemper, R. K.; Erlandson, K. J.; Lakdawala, A. S.; Sun, A.; Prussia, A.; Boonsombat, J.; Aki-Sener, E.; Yalcin, I.; Yildiz, I.; Temiz-Arpaci, O.; Tekiner, B.; Liotta, D. C.; Snyder, J. P.; Compans, R. W. A target site for template-based design of measles virus entry inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5628–5633.
- (21) Sanchez-Céspedes, J.; Moyer, C. L.; Whitby, L. R.; Boger, D. L.; Nemerow, G. R. Inhibition of adenovirus replication by a trisubstituted piperazin-2-one derivative. *Antiviral Res.* **2014**, *108*, 65–73.
- (22) (a) Lee, A. M.; Rojek, J. M.; Spiropoulou, C. F.; Gundersen, A. T.; Jin, W.; Shaginian, A.; York, J.; Nunberg, J. H.; Boger, D. L.

Oldstone, M. B.; Kunz, S. Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 18734–18742. (b) Whitby, L. R.; Lee, A. M.; Kunz, S.; Oldstone, M. B.; Boger, D. L. Characterization of lassa virus cell entry inhibitors: Determination of the active enantiomer by asymmetric synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3771–3774.

(23) (a) Vega-Pérez, J. M.; Perinán, I.; Argandoña, M.; Vega-Holm, M.; Palo-Nieto, C.; Burgos-Morón, E.; López-Lázaro, M.; Vargas, C.; Nieto, J. J.; Iglesias-Guerra, F. Isoprenyl-thiourea and urea derivatives as new farnesyl diphosphate analogues: Synthesis and in vitro antimicrobial and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 591–612. (b) Romero Gómez, M.; Bautista Palomas, J. D.; Vega-Pérez, J. M.; Iglesias-Guerra, F.; Perinán Domínguez, I.; Díaz Herrero, M. M.; Jover Cobos, M. Use of the compound N-phenyl-N'-(3-methyl-2-butenyl)thiourea for treatment of hepatic encephalopathy. P.C.T. Int. Appl. WO 2011/2011076967 A1, 2011. (c) Vega-Pérez, J. M.; Palo-Nieto, C.; Vega-Holm, M.; Góngora-Vargas, P.; Calderón-Montaña, J. M.; Burgos-Morón, E.; López-Lázaro, M.; Iglesias-Guerra, F. Aziridines from alkenyl- β -D-galactopyranoside derivatives: Stereoselective synthesis and in vitro selective anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 380–392. (d) Vega-Pérez, J. M.; Palo-Nieto, C.; Perinán, I.; Vega-Holm, M.; Calderón-Montaña, J. M.; López-Lázaro, M.; Iglesias-Guerra, F. Stereoselective dihydroxylation reaction of alkenyl β -D-hexopyranosides: A methodology for the synthesis of glycosylglycerol derivatives and 1-O-acyl-3-O- β -D-glycosyl-sn-glycerol analogues. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1237–1252.

(24) (a) Cote, M.; Misasi, J.; Ren, T.; Bruchez, A.; Lee, K.; Filone, C. M.; Hensley, L.; Li, Q.; Ory, D.; Chandran, K.; Cunningham, J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **2011**, *477*, 344–348. (b) Zhang, X.; Wang, H.; Li, Y.; Cao, R.; Zhong, W.; Zheng, Z.; Wang, G.; Xiao, J.; Li, S. Novel substituted heteroaromatic piperazine and piperidine derivatives as inhibitors of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *Molecules* **2013**, *18*, 5059–5071.

(25) Bremner, K. H.; Scherer, J.; Yi, J.; Vershinin, M.; Gross, S. P.; Vallee, R. B. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 523–535.

(26) Strunze, S.; Engelke, M. F.; Wang, I. H.; Puntener, D.; Boucke, K.; Schleich, S.; Way, M.; Schoenenberger, P.; Burckhardt, C. J.; Greber, U. F. Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 210–223.

(27) Horwitz, M. S. Adenoviridae and their replication. In *Virology*, 2nd ed.; Fields, B. N., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Eds.; Raven Press: New York, NY, 1991; pp 771–813.

(28) Griffiths, P.; Lumley, S. Cytomegalovirus. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2014**, *27*, 554–559.

(29) Prichard, M. N.; Frederick, S. L.; Daily, S.; Borysko, K. Z.; Townsend, L. B.; Drach, J. C.; Kern, E. R. Benzimidazole analogs inhibit human herpesvirus 6. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2442–2445.

(30) Schleiss, M. R.; Bernstein, D. I.; McVoy, M. A.; Stroup, G.; Bravo, F.; Creasy, B.; McGregor, A.; Henninger, K.; Hallenberger, S. The non-nucleoside antiviral, BAY 38–4766, protects against cytomegalovirus (CMV) disease and mortality in immunocompromised guinea pigs. *Antiviral Res.* **2005**, *65*, 35–43.

(31) Wu, G.; Liu, B.; Zhang, Y.; Li, J.; Arzumanyan, A.; Clayton, M. M.; Schinazi, R. F.; Wang, Z.; Goldmann, S.; Ren, Q.; Zhang, F.; Feitelson, M. A. Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 5344–5354.

(32) Chen, P. H.; Ornelles, D. A.; Shenk, T. The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J. Virol.* **1993**, *67*, 3507–3514.

(33) Greber, U. F.; Webster, P.; Weber, J.; Helenius, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1766–1777.

(34) Mangel, W. F.; Baniecki, M. L.; McGrath, W. J. Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2347–2355.

(35) Perez-Berna, A. J.; Mangel, W. F.; McGrath, W. J.; Graziano, V.; Flint, J.; San Martin, C. Processing of the I1 52/55k protein by the adenovirus protease: a new substrate and new insights into virion maturation. *J. Virol.* **2014**, *88*, 1513–1524.

(36) Klaus, J. L.; Rasnick, D.; Palmer, J. T.; Kuo, E. Y. L. Reversible cysteine protease inhibitors. In *Google Patents*, 1996.

(37) Sánchez-Céspedes, J.; Pachón-Ibáñez, M. E.; Pachón-Díaz, J.; Martínez Aguado, P.; Cebrero Cangueiro, T.; Vega-Pérez, J. M.; Iglesias-Guerra, F.; Vega-Holm, M.; Candela Lena, J. I.; et al. Piperazine derivatives as antiviral agents with increased therapeutic activity. European Patent EP16382073.1, 2016.

(38) Das, B.; Rudra, S.; Yadav, A.; Ray, A.; Raja Rao, R. A. V. S.; Srinivas, A. S. S. V.; Soni, A.; Saini, S.; Shukla, S.; Pandya, M.; Bhateja, P.; Malhotra, S.; Mathur, T.; Arora, S. K.; Rattan, A.; Mehta, A. Synthesis and SRA of novel oxazolidinones: Discovery of ranbezolid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4261–4267.

(39) Kim, T.-H.; Yang, G.-Y. N-Acyl-4,5-dihydro-4,4-dimethyl-N-methyl-2-thiazolamine as a chemoselective acylating agent. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9553–9557.

(40) Wang, T.; Kadow, J. F.; Zhang, Z.; Yin, Z.; Gao, Q.; Wu, D.; Parker, D. D.; Yang, Z.; Zadjura, L.; Robinson, B. A.; Gong, Y.-F.; Blair, W. S.; Shi, P.-Y.; Yamanaka, G.; Lin, P.-F.; Meanwell, N. A. Inhibitors of HIV-1 attachment. Part 4: A study of the effect of piperazine substitution patterns on antiviral potency in the context of indole-based derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5140–5145.

(41) Nguyen, E. K.; Nemerow, G. R.; Smith, J. G. Direct evidence from single-cell analysis that human $\{\alpha\}$ -defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4041–4049.

(42) Nepomuceno, R. R.; Pache, L.; Nemerow, G. R. Enhancement of gene transfer to human myeloid cells by adenovirus-fiber complexes. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 571–578.

(43) Cheng, H. Y.; Lin, C. C.; Lin, T. C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 447–455.

(44) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.

(45) Rivera, A. A.; Wang, M.; Suzuki, K.; Uil, T. G.; Krasnykh, V.; Curiel, D. T.; Nettelbeck, D. M. Mode of transgene expression after fusion to early or late viral genes of a conditionally replicating adenovirus via an optimized internal ribosome entry site in vitro and in vivo. *Virology* **2004**, *320*, 121–134.

(46) Schreiner, S.; Martinez, R.; Groitl, P.; Rayne, F.; Vaillant, R.; Wimmer, P.; Bossis, G.; Sternsdorf, T.; Marcinowski, L.; Ruzsics, Z.; Dobner, T.; Wodrich, H. Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002549.

(47) Reed, L. V.; Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **1938**, *27*, 493–497.

Supporting Information

New 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives as potential inhibitors of adenovirus. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships.

Javier Sánchez-Céspedes,^{a†*} Pablo Martínez-Aguado,^{a†} Margarita Vega-Holm,^{b†} Ana Serna-Gallego,^a José Ignacio Candela,^b José Antonio Marrugal-Lorenzo,^a Jerónimo Pachón,^a Fernando Iglesias-Guerra^{b*} and José Manuel Vega-Pérez^b

^aInstitute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine. Sevilla, Spain. ^bDepartment of Organic and Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Seville, 41071, Seville, Spain.

E-mail: iglesias@us.es
E-mail: jsanchez-ibis@us.es

CONTENTS

Figure S2	Dose-response inhibitory activity at low MOI
Figure S3	Dose-response inhibitory activity at high MOI

Figure S2. Dose-dependent inhibitory activity of the 2-phenylpiperazine derivatives **46**, **59**, **60**, **63**, **64** and **65** against HAdV5-GFP (A) and HAdV16-GFP (B) in a low MOI single round infection assay using 293b5 cell line. For all panels, the negative control (–) is non-infected cells, while the positive control (+) is cells infected at the same MOI but in absence of compound. Data are presented as the mean \pm SD from triplicate assays.

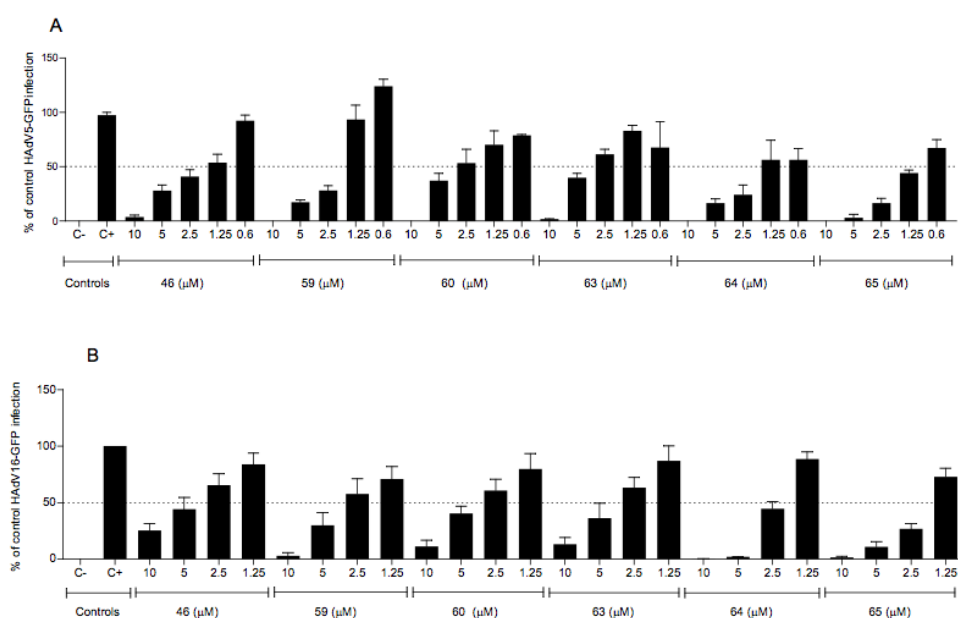
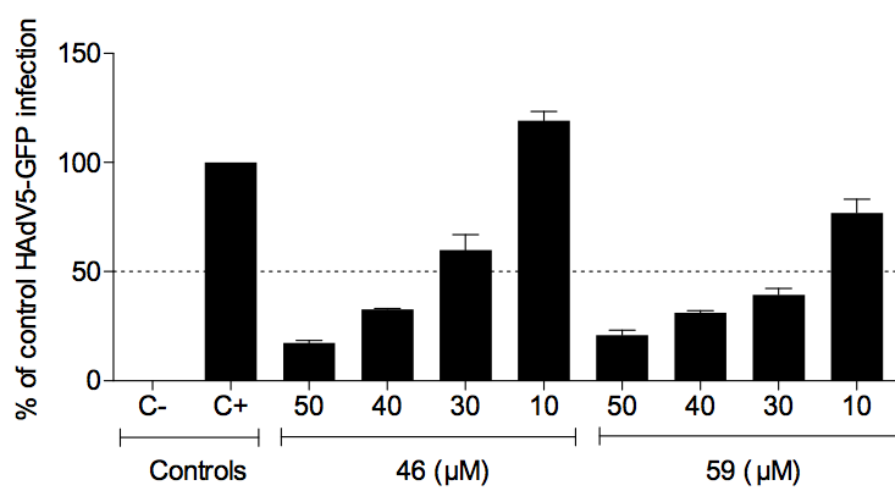


Figure S3. Dose-dependent activity of compounds **46** and **59** against HAdV5-GFP in a high MOI single round infection assay using A549 cells. For all panels, the negative control (–) is non-infected cells, while the positive control (+) is cells infected at the same MOI but in absence of compound. Data are presented as the mean \pm SD from triplicate assays.



1.2. Resultados adicionales

1.2.1. Ensayo de inhibición de la polimerasa de phi29 (ϕ 29) mediante PCR cuantitativa

La actividad de amplio espectro mostrada por los compuestos **46**, **59**, **60**, **63**, **64** y **65**, sugiere un posible mecanismo de acción sobre una diana proteica específica que podría ser celular o viral. Para estudiar una posible diana viral, analizamos si la presencia de los compuestos afectaba a la actividad *in vitro* de la DNA polimerasa del bacteriófago ϕ 29, una ADN polimerasa con una elevada homología respecto de las de HAdV y HCMV que de hecho pertenecen a la misma familia de ADN polimerasas.

Para llevar a cabo este ensayo se procedió a la purificación de ADN viral procedente de un lisado de HAdV5-wt con el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se realizó la amplificación de las muestras de ADN viral previamente purificado (10 ng) en presencia de los compuestos a una concentración de 50 μ M o la misma cantidad de DMSO por triplicado y de acuerdo con el protocolo del kit ilustra GenomiPhi V2 DNA Amplification (GE Healthcare Life Sciences). De esta manera, si los compuestos ejercen un efecto inhibitor sobre la actividad de la polimerasa de ϕ 29, se observaría una disminución en la cantidad de productos amplificados por la misma, que podríamos cuantificar posteriormente.

Para poder cuantificar los productos amplificados, se realizó una PCR a tiempo real cuantitativa, y se diseñaron cebadores TaqMan y sondas para una región del hexón de HAdV5-wt con el GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design software (GenScript). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron AQ1: 5'-GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT -3'; AQ2: 5'-GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT -3'; y AP: 6-FAM-5'-TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA-3'-TAMRA. La mezcla de reactivos para PCR a tiempo real cuantitativa consistía en 2 μ L del ADN purificado, los cebadores AQ1 y AQ2 a una concentración de 200 nM cada uno, y la sonda AP a una concentración de 10 μ M en un volumen total de 12,5 μ L más 12,5 μ L de KAPA

PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems). El protocolo para esta PCR fue de 95°C durante 3 min seguido de 40 ciclos a 95°C durante 10s y 60°C durante 30 segundos. Todos los ensayos se realizaron en un termociclador C1000 ThermalCycler (BioRad). Los resultados representan la media \pm SD de las muestras por triplicado de tres experimentos independientes.

Después de analizar cada una de las muestras por triplicado, la presencia de los compuestos **59**, **64** y **65** a una concentración de 50 μ M inhibieron de manera significativa la actividad *in vitro* de la ADN polimerasa de ϕ 29 en más de un 50% (tabla 2). Sin embargo, los compuestos **46**, **60** y **63** no mostraron una inhibición significativa de la actividad de la polimerasa de ϕ 29 cuando se compararon con el control tratado con el mismo volumen de DMSO. Concretamente, la presencia del compuesto **46** no provocó efecto inhibitorio alguno sobre la actividad de la polimerasa, mientras que los compuestos **60** y **63** la inhibieron menos de un 10%.

Compuesto	% Inhibición actividad ϕ 29 Polimerasa
46	0
59	77,52 \pm 0,39
60	2,77 \pm 0,31
63	8,61 \pm 1,99
64	64 \pm 1,54
65	82,96 \pm 0,36

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la actividad de los compuestos **46**, **59**, **60**, **63**, **64** y **65** a 50 μ M sobre la ADN polimerasa de ϕ 29 comparados con un control en presencia de DMSO.

2. Desarrollo de inhibidores de la AVP de la proteasa de adenovirus (AVP)

2.1. Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores específicos de la AVP: inmunofluorescencia indirecta.

El objetivo de este estudio fue diseñar, sintetizar y evaluar pequeñas moléculas con actividad anti-HAdV dirigidas específicamente a la AVP.

Se ha demostrado que en la fase tardía de la infección de HAdV, la AVP escinde a la citoqueratina 18, lo que conduce a la destrucción de la red de citoqueratina y en última instancia, a la lisis de la célula hospedadora y consecuente liberación de la progenie viral. El fenómeno de degradación de la citoqueratina 18 puede observarse mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en la célula huésped infectadas por HAdV. A las 24 horas postinfección, la destrucción parcial de la red de citoqueratina da lugar a estructuras con forma esférica dispersas por todo el citoplasma, mientras que a las 36 horas la destrucción es completa (Figura 5).

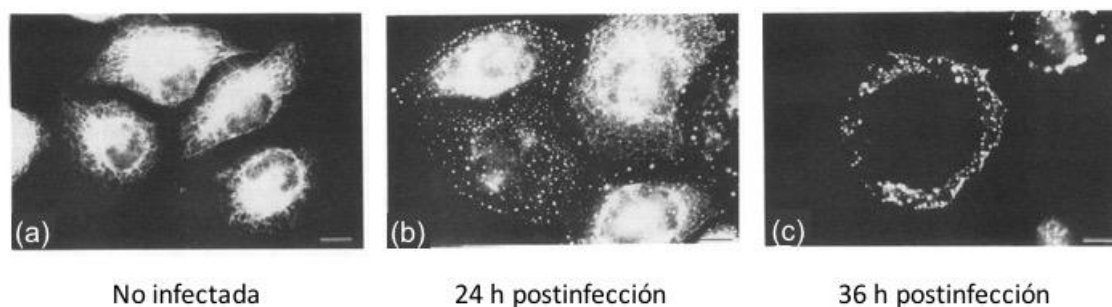


Figura 5. Análisis de inmunofluorescencia con marcaje específico de anticuerpos contra la citoqueratina 18 en células HeLa sanas (a), e infectadas con HAdV a las 24 (b) y 36 horas postinfección (c). Adaptado de Chen P. et al., 1993.

Mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y marcaje específico con un anticuerpo anti-citoqueratina 18 nos propusimos evaluar el potencial efecto inhibitor de dos librerías de compuestos de la actividad de la AVP en células HeLa infectadas por HAdV.

Para medir el efecto inhibitorio sobre la AVP de los compuestos se pretendía desarrollar un método cuantitativo basado en la cuantificación del punteado característico que se observa a consecuencia de la destrucción de la red de citoqueratina por la AVP a partir de las 24 postinfección. En primer lugar, para poder establecer este método cuantitativo automatizado, se infectaron células HeLa con HAdV, se marcaron con anticuerpos específicos anti-citoqueratina 18 y las células se fijaron y procesaron a distintos tiempos (0h, 24, 30, 32, 34 y 36 horas) con objeto de seleccionar la hora postinfección donde mejor se observase el fenómeno mediante inmunofluorescencia indirecta.

Al analizar los resultados de este ensayo, cabía esperar que todas las células infectadas presentasen a partir de las 24 horas postinfección las estructuras globulares dispersas por la degradación de la citoqueratina, pero solo estaban presentes en algunas células a los distintos tiempos. Por tanto, no pudo establecerse un método cuantitativo a partir de la observación de estas estructuras. Sin embargo, la intensidad de la tinción de citoqueratina 18 disminuye a medida que progresa la infección en las células, y por consiguiente estos niveles de intensidad podrían ser analizados y cuantificados mediante inmunofluorescencia indirecta.

A la vista de estos resultados, y descartado el método de cuantificación a partir de los patrones de degradación de la citoqueratina, se decidieron estudiar los efectos sobre la degradación de la red de citoqueratina causada por la AVP, mediante inmunofluorescencia indirecta, dirigiendo anticuerpos contra la citoqueratina 18 celular, y estudiando los cambios producidos en la intensidad de la fluorescencia de estos anticuerpos en presencia de librerías de compuestos anti-HAdV. Además se usaron otros anticuerpos para la detección de la intensidad de proteínas virales de expresión temprana (E4orf3) y tardía (proteínas de la cápsida de HAdV5 de HAdV, para caracterizar en mayor profundidad los mecanismos de inhibición de los distintos compuestos y relacionarlos con una posible inhibición de la AVP. La figura 6 muestra un ejemplo del marcaje con los anticuerpos contra los genes tempranos (E4orf3),

tardíos (proteínas tardías) y la citoqueratina 18 celular para la detección de inmunofluorescencia en células infectadas y sanas. Es importante destacar la disminución que se observa en la intensidad de la tinción de citoqueratina 18 celular (verde) en las células infectadas respecto a las no infectadas a causa de la destrucción de red de citoqueratina por la infección de HAdV.

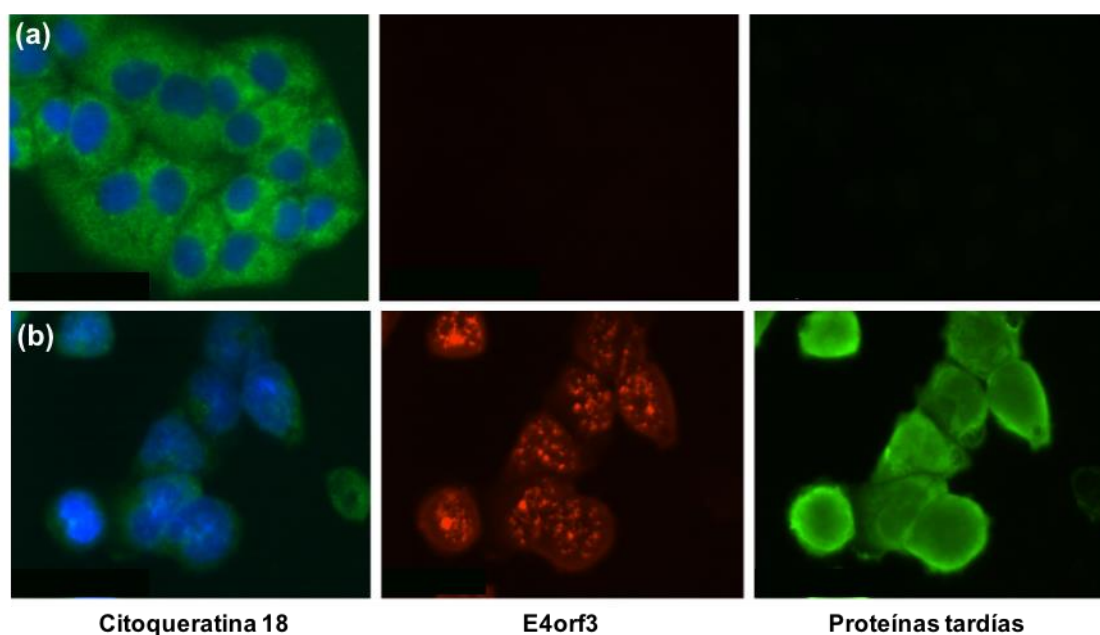


Figura 6. Ejemplo de marcaje en células HeLa sanas (a) e infectadas con dl309 (b) tratadas con DMSO con anticuerpos dirigidos contra citoqueratina 18 celular (verde), y E4orf3 (rojo) y proteínas tardías (verde) de HAdV. Los núcleos se definieron con la tinción DAPI (azul).

Conviene destacar, que estos experimentos consisten en aproximaciones experimentales para evaluar de manera indirecta los potenciales mecanismos de acción de los compuestos derivados de piperazina a través de los cuales podrían inhibir la actividad de la AVP. En el apartado 2.1. de la sección Anexo se detallan los compuestos estudiados y los materiales y métodos empleados en este ensayo.

2.1.1. Resultados

2.1.1.1. Análisis del impacto de los compuestos evaluados en la expresión de los genes tempranos (E4orf3) y tardíos (proteínas estructurales) de HAdV

El principal objetivo de ese experimento fue estudiar si la presencia de los compuestos con actividad anti-HAdV generaba modificaciones en la expresión de los genes virales tempranos y tardíos de células infectadas por dl309 tras 28 horas de infección. Para el estudio de los genes de la región temprana de HAdV se seleccionaron anticuerpos dirigidos contra la proteína E4orf3, involucrada en procesos fundamentales para el desarrollo de la infección como el procesamiento y transporte del ARN viral desde el núcleo, la detención de la síntesis de proteínas celulares o la neutralización de la respuesta celular a daños producidos en el ADN durante la infección. Para la detección de proteínas de expresión tardía de HAdV se dirigieron anticuerpos contra proteínas estructurales de la cápsida de HAdV5, incluyendo el hexón, las fibras y pentonas.

La figura 7 muestra los cambios en la intensidad media de los valores de la fluorescencia de E4orf3 para las muestras tratadas con los distintos compuestos a una concentración de 50 μ M respecto a las tratadas con el mismo volumen de DMSO.

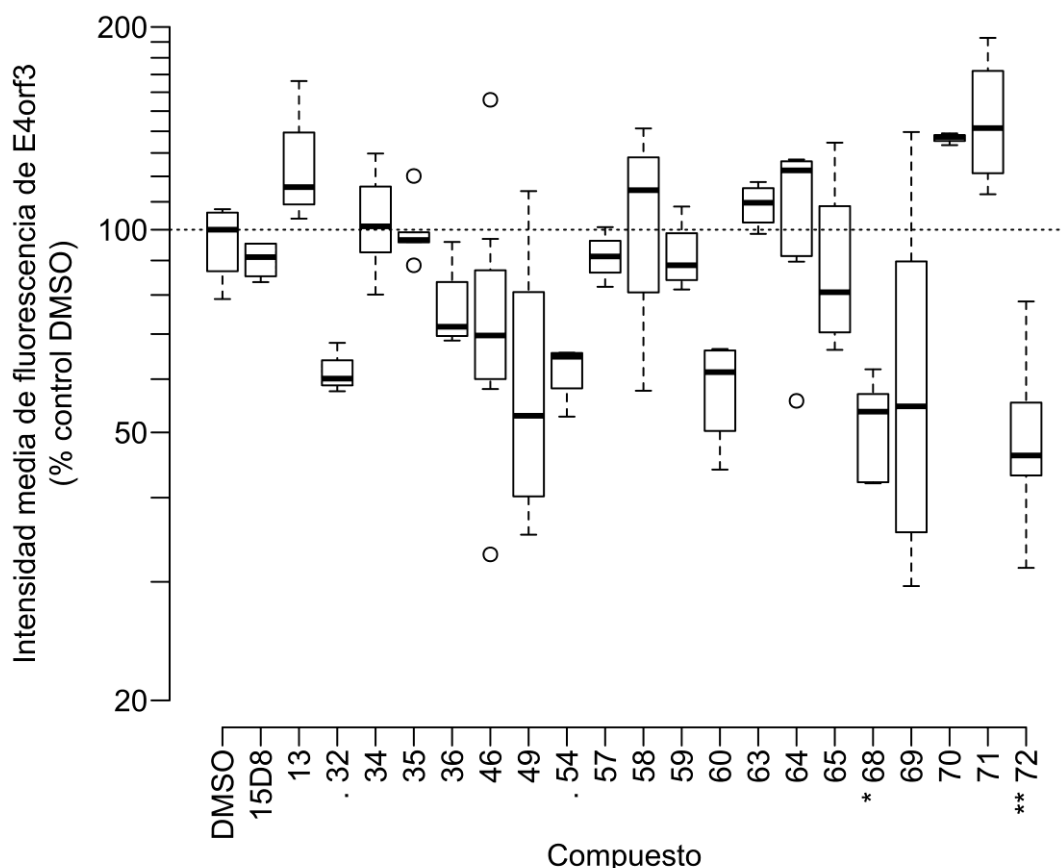


Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes mostrando el porcentaje respecto a las muestras tratadas con DMSO de la intensidad media de fluorescencia de la proteína de expresión temprana E4orf3 en células HeLa infectadas con dl309 y tratadas con 50µM de cada uno de los compuestos. Las cajas muestran los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea sólida horizontal), los percentiles 25 y 50 (línea externa) y las observaciones máximas y mínimas (bigotes). *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, * $p < 0,1$ vs. DMSO.

Ninguno de los compuestos estudiados en este ensayo reduce de manera significativa (>50%) la intensidad media de la expresión los genes tempranos del virus. Sólo los compuestos **68** y **72** generaron una reducción significativa del 35% en la intensidad de E4orf3. Por tanto, en términos generales, ninguno de estos compuestos parece ejercer su efecto anti-HAdV, al menos de manera significativa mediante una inhibición en la expresión de estas proteínas de la región temprana de HAdV.

En este mismo ensayo se emplearon anticuerpos dirigidos contra las proteínas estructurales que conforman la cápsida de HAdV para analizar los

niveles de expresión de proteínas tardías en presencia de los compuestos (Figura 8). Cinco de los compuestos evaluados (**32**, **54**, **60**, **68** y **72**) mostraron disminuciones significativas de la fluorescencia de las proteínas tardías que iban del 77% al 81%.

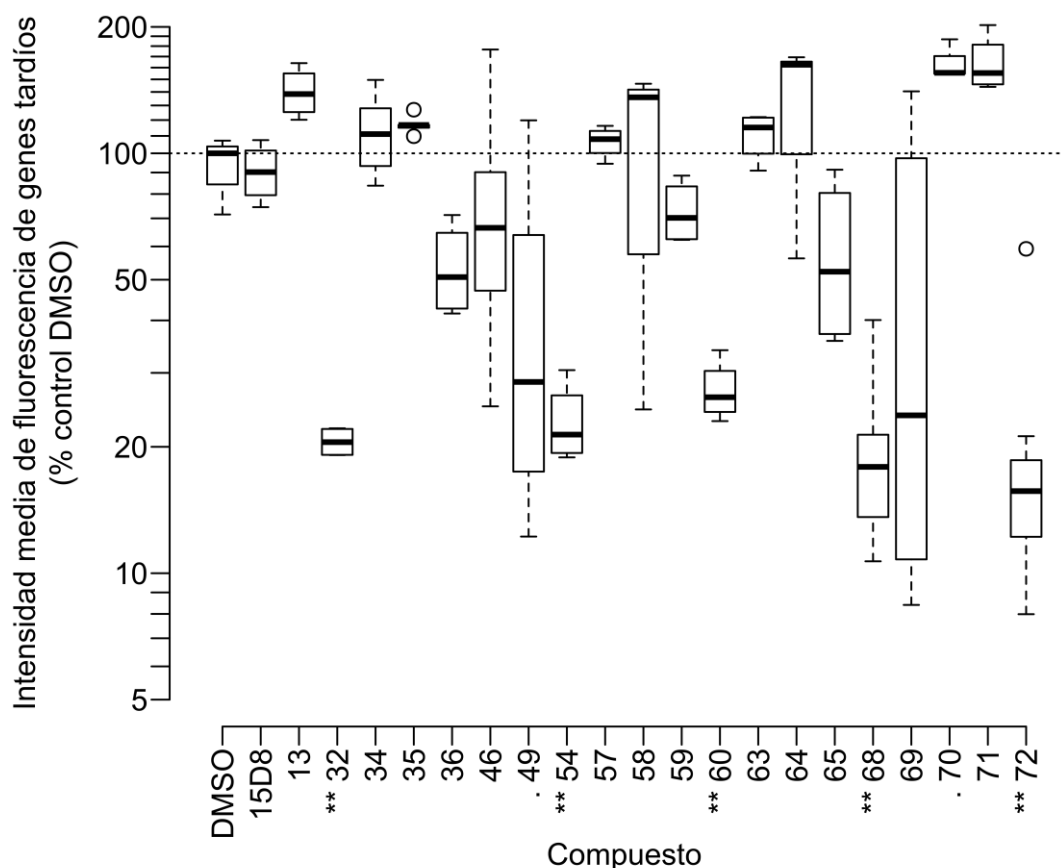


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes mostrando el porcentaje respecto a las muestras tratadas con DMSO de la intensidad media de fluorescencia de las proteínas virales de expresión tardía (proteínas de la cápsida) en células HeLa infectadas con dl309 y tratadas con 50µM de cada uno de los compuestos. Las cajas muestran los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea sólida horizontal), los percentiles 25 y 50 (línea externa) y las observaciones máximas y mínimas (bigotes). *** p < 0,01, ' ' p < 0,1 vs. DMSO.

Para determinar si alguno de los compuestos reducía de manera selectiva la expresión de proteínas virales tardías comparada con la de las proteínas tempranas, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión de E4orf3 y las proteínas de la cápsida (coeficiente de correlación de Spearman). La figura 9 muestra los valores logarítmicos de la intensidad media

de fluorescencia para cada caso en presencia de los compuestos o la misma cantidad de DMSO. Este ensayo muestra que los compuestos DMSO, **34**, **35**, **36**, **46**, **49**, **57**, **58**, **59**, **64**, **68**, **69**, **71** y **72** presentan una correlación estadística significativa entre los niveles de expresión de los genes tempranos y tardíos, y por tanto este resultado sugiere que no modifican selectivamente la expresión de las genes virales tardíos.

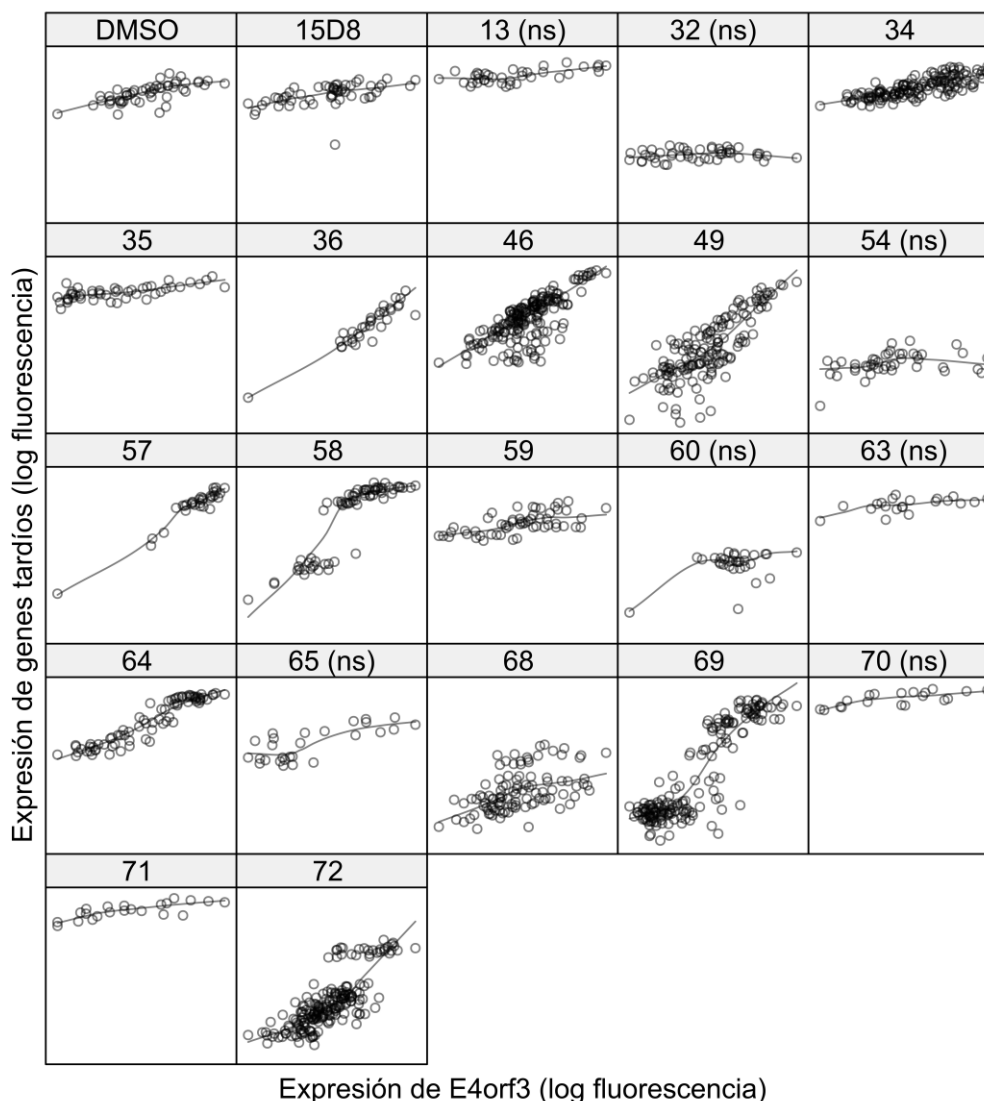


Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de expresión de E4orf3 y las proteínas tardías de la cápsida de HAdV. Se muestran los valores logarítmicos de la intensidad media de fluorescencia para las proteínas tempranas y tardías en presencia de los compuestos o la misma cantidad de DMSO. Los límites del eje x se modificaron para dar cabida a todo el rango de expresión E4ORF3 (valores del eje x). Los límites del eje y se fijaron para permitir la comparación directa de la expresión génica tardía (valores del eje y) entre los paneles. Se

empleó una línea curva continua para el test de correlación. “ns” indica ausencia de correlación entre ambas variables.

Los compuestos **13**, **32**, **54**, **60**, **63**, **65**, y **70** no mantienen esta correlación. Los compuestos **32**, **54** y **60** ya habían mostrado una reducción significativa de la expresión de genes tardíos, por tanto esto podría justificar su selectividad al inhibir la expresión de las proteínas de la cápsida de HAdV. Como se observa en la misma figura, la reducción en la intensidad de la fluorescencia específica de genes tardíos causada por el compuesto **65** es más moderada. Pese a mostrar una falta de correlación entre los parámetros estudiados, los compuestos **13** y **70** presentan unos niveles elevados en la intensidad del marcaje de las proteínas tardías de HAdV. Este resultado sugiere dos posibilidades: i) La primera sería que estos dos compuestos incrementaran la expresión de los genes tardíos; ii) y la segunda sería que aceleraran la fase de inactivación de la expresión génica temprana sin afectar la expresión génica tardía.

2.1.1.2. Análisis de la intensidad de la citoqueratina celular

En la fase tardía de la infección, la citoqueratina 18 es degradada por la acción de la AVP, para la que presenta dos secuencias de corte específicas, lo que conduce a la destrucción de la red de citoqueratina celular. El objetivo de este experimento fue estudiar si existía un efecto protector que redujese la degradación en la red de citoqueratina celular causada por la AVP en células infectadas y tratadas con los diferentes compuestos. Para este ensayo se analizó el efecto de los compuestos derivados de fenilpiperazina que ya habían mostrado una mayor actividad anti-HAdV (**46**, **59**, **60**, **63**, **64** y **65**) y aquellos diseñados específicamente para interaccionar con la AVP e inhibir su actividad (**68**, **69**, **70**, **71** y **72**). Para obtener esta información se representó el ratio de la intensidad relativa de la citoqueratina 18 de las células infectadas respecto a las no infectadas y tratadas con cada uno de los compuestos (Figura 10). La banda azul muestra la reducción causada en la intensidad relativa de

citoqueratina 18 debida a la infección por HAdV (dl309). Los valores superiores a 1 en la gráfica indican que la intensidad de la tinción de citoqueratina es mayor en las células infectadas que en las no infectadas, y esto sugiere que los compuestos evaluados estarían previniendo de la degradación de la red de citoqueratina por parte de la AVP, lo cual se observa en presencia de los compuestos **65**, **68**, **70** y **71**.

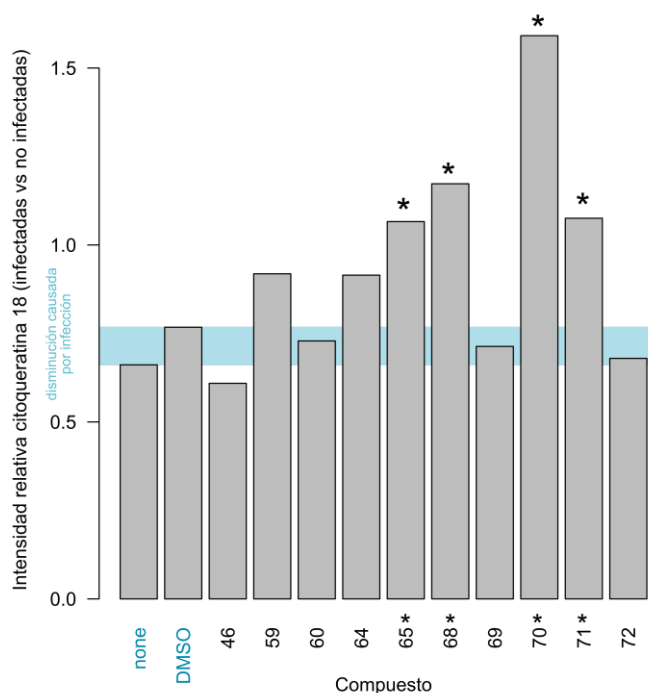


Figura 10. Ratio de la intensidad de expresión de citoqueratina celular en células infectadas (dl309) con respecto a las no infectadas, tratados con DMSO o los distintos compuestos. La banda azul muestra la reducción causada en la intensidad relativa de citoqueratina 18 debida a la infección por HAdV (dl309). Los valores superiores a 1 indican que la intensidad de la tinción de citoqueratina es superior en las células infectadas respecto a las no infectadas. “None” indica ausencia de tratamiento. Los valores de la $p > 0,05$ indicados con “*” muestran aquellos compuestos que previenen de la reducción en la intensidad de citoqueratina 18 a consecuencia de la infección de HAdV.

2.2. Caracterización estructural de la AVP: Obtención de las estructuras cristalinas de los complejos de AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN

El objetivo de estos ensayos fue tratar de resolver la estructura cristalina de los complejos AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN, que servirán para poder comprender el mecanismo de regulación enzimático que ejercen los cofactores de la AVP a nivel atómico y usar estas estructuras para el diseño de nuevos agentes anti-HAdV.

En primer lugar se trataron de determinar las condiciones adecuadas para obtener la estructura cristalina del complejo AVP-pVlc, y para ello primero debía llevarse a cabo la expresión y purificación de AVP con objeto de obtener suficiente cantidad del mismo para posteriores ensayos y formación de los complejos. En el apartado 2.2.1. de la sección Anexo se detallan los materiales y métodos empleados para su expresión y purificación.

2.2.1. Obtención de los complejos AVP-pVlc

Una vez expresada y purificada la AVP, se procedió a la formación de los complejos AVP-pVlc. Para ello se descongeló un vial conservado a -20°C de AVP (alícuota de 100 µl a una concentración de 183 µM) y se mantuvo en hielo. A este vial se añadieron 1,4 µl de 2-mercaptoetanol a una concentración de 1,43 M y 1,7 µl de pVlc (secuencia de aminoácidos: GVQSLKRRRCF, Invitrogen) a una concentración de 20 mM. Se procedió a continuación a sellar el vial con parafilm y se mantuvo a 4°C durante 24h. Durante este tiempo y a esa temperatura se facilita la formación de los complejos AVP-pVlc. Al día siguiente se centrifugó el complejo 15 minutos en la microcentrífuga a 16000 r.p.m. a 4°C para retirar cuidadosamente el sobrenadante y eliminar posibles residuos que no formen parte del complejo. La cantidad de complejo obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría.

2.2.2. Cristalización y obtención de datos mediante rayos-X

Los intentos de cristalización para el complejo AVP-pVlc se realizaron mediante el método de difusión por vapor de la gota sentada (descrito en el apartado 2.3. de la sección Anexo). Se emplearon distintas concentraciones del complejo AVP-pVlc y búffers para tratar de determinar las condiciones para la obtención de los cristales. Los ensayos se realizaron con dos métodos:

- a) Equipo robotizado Crystal Griphon (Art Robbins Instruments). Cuenta con un equipo de aspirado y un dispensador automático que permite el ensayo de múltiples condiciones distintas (96) para obtener la cristalización de proteínas usando placas de 96 pocillos. Se emplearon búffers comerciales PEGRx HT y PEG/ION (Hampton Research) y los búffers fabricados PEG INFAC, HPLS1 y HPLS2 que contienen variaciones en el pH, concentración y pesos moleculares de polietilenglicol (PEG) y sales. La composición química de los búffers fabricados pueden consultarse en el apartado 3. de la sección Anexo.
- b) Ensayos en placas de 24 pocillos. Se emplearon dos buffers distintos a los que se hicieron posteriores modificaciones en el pH y concentraciones de los reactivos: (a) 1,6 M de acetato sódico, 0,1 M de citrato sódico, pH 6,2, 1 mM DTT. (b) 19% iso-propanol, 0,095 M de citrato sódico, pH 5,6, 19% de PEG y 5% de glicerol.

Después de estudiar diversas condiciones, uno de los ensayos en placas de 24 pocillos permitió la obtención de cristales del complejo AVP-pVlc (Figura 11). La proteasa de HAdV2 fue cristalizada con su cofactor pVlc en un ratio molar de AVP:pVlc 1:1,3, a una temperatura de 4°C después de una semana de incubación y en un medio que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc.

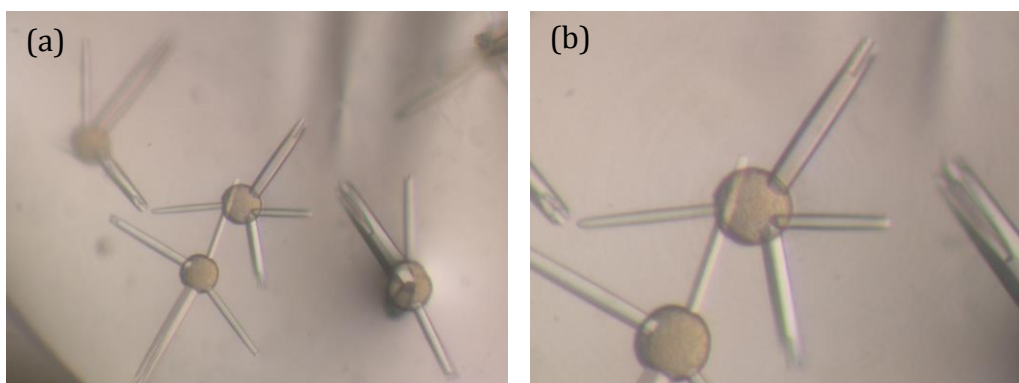


Figura 11. Formaciones cristalinas de los complejos AVP-pVlc en forma de largas barras hexagonales tras 24h de incubación a 4°C en un medio que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc (a). Detalle de las estructuras cristalinas a mayor aumento (b).

Posteriormente se procedió a la crioprotección de los cristales obtenidos con MPD (2-Metil-2,4-pentanediol) y se congelaron en nitrógeno líquido para la obtención de datos mediante difracción de rayos-X. Los datos estadísticos de difracción se obtuvieron mediante un detector Rigaku Saturn 70 CCD a una longitud de onda de rayos-X de 1,54 Å (Tabla 3). Los cristales difractaron a una resolución de 2,1 Å.

2.2.3. Solución de la estructura y refinamiento

Los cristales de AVP-pVlc fueron indexados en un grupo espacial $P6_1$ usando el programa D*TREK [124]. La siguiente etapa consistió en realizar el reemplazamiento molecular empleando como referencia la molécula 1AVP obtenida de Protein Data Bank (PDB). Usando el programa MolRep [125] se encontró una molécula por ASU (unidad asimétrica), para que mediante Coot [126] se llevara a cabo la construcción del modelo, y el posterior refinamiento de la estructura con REFMAC5 [127] y PDB_REDO [128]. Del modelo se obtuvieron una R_{work} = 17,6% y R_{free} = 19,7%. En último lugar la estructura resultante (Figura 12) se depositó en PDB con el código de acceso 5FGY.

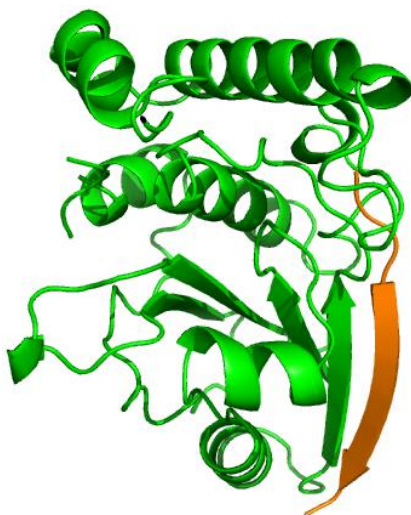


Figura 12. Modelo tridimensional AVP-pVlc obtenida tras solución y refinamiento de la estructura. Estructura de la AVP (verde) y el cofactor pVlc (naranja).

Tabla 3. Datos de difracción de rayos-X y estadísticas de refinamiento.

Data Collection	
Wavelength (λ) (\AA)	1.54
Space group	P61
Unit Cell (a,b,c) (\AA)	112.4, 112.4, 49.5
Unit Cell (α,β,γ) ($^\circ$)	90, 90, 120
Resolution Range (\AA)	97-2.1 (2.18-2.10)
Total Reflections	20,733
Completeness (%)	98.3 (95.7)
Rmerge	0.059 (0.196)
Mean $I/\sigma(I)$	16 (6)
Average Redundancy	5.54 (4.46)
Refinement	
Working Set Reflections	18,667
Test Set Reflections	1,033
Rwork	0.176
Rfree	0.197
R.M.S.D. Bond Lengths (\AA)	0.013
R.M.S.D Bond Angles ($^\circ$)	1.59
Average B Factors (\AA^2)	13.2

Los valores entre paréntesis indican los valores extremos para la resolución del Shell.

La estructura tridimensional del complejo cristalino AVP:pVlc obtenida en este trabajo mediante difracción de rayos-X a 2,1 Å posee una alta calidad de resolución, así como los datos referentes a la difracción y refinamiento de estructura del complejo AVP-pVlc comparado con la estructuras previamente determinadas a 2,6 Å y 1,6 Å [115,129] y depositadas en PDB (PDB: 1AVP y 1NLN). El informe completo correspondiente al estudio de validación de la estructura por rayos-X, puede consultarse en el apartado 3. de la sección Anexo.

2.2.4. Obtención de los complejos AVP-pVlc-ADN

Una vez establecidas las condiciones de cristalización de los complejos AVP-pVlc, la siguiente etapa consistía en tratar de llevar a cabo la cristalización del complejo ternario compuesto por AVP-pVlc-oligos de ADN de doble cadena.

En primer lugar se procedió a la hibridación de secuencias de oligonucleótidos de una sola cadena, mediante la combinación de cantidades equimolares de los mismos para generar dúplex de ADN de distintos tamaños que serán empleados para tratar de obtener los complejos de AVP-pVlc-ADN. Se generaron dúplex de 9 tamaños diferentes, de 10 a 18 pares de bases (pb). El protocolo para hibridar las secuencias fue el siguiente:

- a) Combinar cantidades equimolares de cada uno de los oligos que conformarán el dúplex de ADN.
- b) Añadir annealing buffer 10x.
- c) Calentar las muestras a 90°C, y dejar enfriar a temperatura ambiente. A continuación mantener durante 30 minutos en hielo.
- d) Conservar los dúplex a 4°C.

Para obtener las estructuras formadas por AVP-pVlc-ADN, el proceso consistió en añadir de manera independiente los dúplex de ADN de distintos tamaños a los complejos de AVP-pVlc formados durante las previas 24h y dejar incubarse durante 2 horas a 4°C. Para los ensayos de cristalización, se empleó el método de difusión por vapor en placas de 24 pocillos y el equipo robotizado Crystal Griphon con los mismos buffers usados previamente en los ensayos de cristalización de AVP-pVlc.

Desafortunadamente, ninguna de las condiciones empleadas permitió la obtención de la estructura cristalina del trímero, pero se obtuvieron formaciones conocidas como “clusters” y “agujas” que indican que una optimización de las condiciones del ensayo podrían mejorar el crecimiento de los cristales. La presencia de dúplex de ADN de 12 pb y el empleo del buffer que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc, igualmente usado para obtener cristales del complejo AVP-pVlc a 4°C de temperatura, fueron los factores determinantes que permitieron observar estas estructuras (Figura 13).

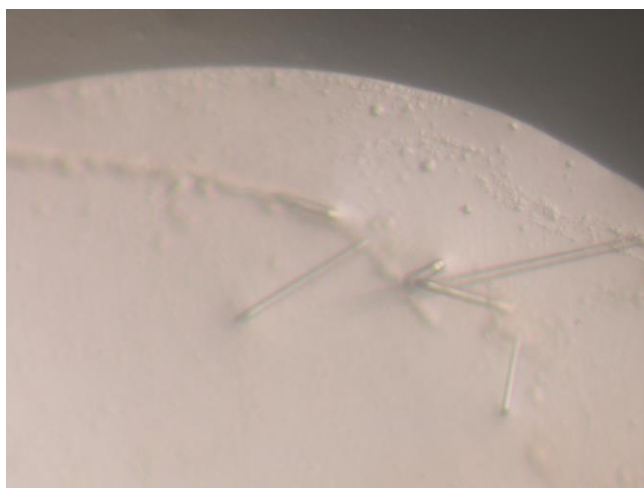


Figura 13. Obtención de “agujas” de los complejos AVP-pVlc-ADN tras 24h de incubación a 4°C en presencia de nucleótidos de 12 pb y el búffer en un medio que contenía 0,1 M de citrato sódico pH 6,4, 1,7 M de acetato sódico, 1 mM de DTT y 10 mg/ml del complejo AVP-pVlc.

En un intento de obtener información de las estructuras denominadas “agujas”, éstas se estudiaron empleando de un generador-detector de rayos-X. La naturaleza de estas formaciones no permitió la obtención de información que revelara datos concernientes a la estructura de los mismos, lo que indica que las condiciones particulares empleadas en este método de difusión por vapor deben optimizarse. Generalmente en estas circunstancias una ligera reducción en la cantidad de proteína y/o precipitante son determinantes para que se desbloquee la fase de nucleación en la que está detenido el experimento, además de mantener una baja temperatura en todo el proceso (4°C).

VI. DISCUSIÓN

Durante las últimas 2 décadas, los HAdV se han convertido en un importante patógeno en individuos inmunocomprometidos y especialmente en el entorno de los trasplantes. Aunque los síntomas más comunes de infecciones por HAdV en pacientes sanos están relacionados con infecciones como faringitis, otitis media, bronquiolitis, gastroenteritis y queratoconjuntivitis severa, entre el 50% y 80% de los pacientes pediátricos receptores de TPH desarrollan serias complicaciones como cistitis y enteritis hemorrágicas, y en ciertos casos encefalitis, neumonitis, hepatitis, nefritis o insuficiencia multiorgánica con resultado de muerte [2,83].

Actualmente, aunque son varios los compuestos que han demostrado eficacia *in vitro* frente a los HAdV, no existe una terapia antiviral específica aprobada por las autoridades sanitarias para su tratamiento. Se están realizando ensayos clínicos con compuestos prometedores, como el caso del brincidofivir (hexadeciloxipropil-cidofovir, conocido como CMX001), pero aún deben conocerse los resultados del ensayo clínico para la evaluación de su eficacia y seguridad en el tratamiento de infecciones por HAdV que actualmente se encuentra en la fase III (ClinicalTrials.gov; identificador: NCT02087306). El cidofovir, con una efectividad razonable frente a las infecciones por HAdV, tiene un uso limitado solo para casos graves dado el alto riesgo de nefrotoxicidad asociada [130]. Además, desde 2014 Gilead, la empresa encargada de su producción y comercialización, anunció el cese en su comercialización por existir mejores alternativas para el tratamiento de la retinitis por HCMV, la indicación para la que fue aprobada. De manera ocasional también se han empleado ribavirina y ganciclovir pero los datos clínicos disponibles sobre la eficacia de estas fármacos son insuficientes. Por tanto, debido al impacto clínico de las infecciones por HAdV, resulta necesaria la búsqueda de nuevos compuestos seguros y eficaces para combatir las infecciones producidas por este virus.

En el trabajo desarrollado en esta tesis se ha comprobado que la síntesis de una nueva generación de compuestos derivados de 2-fenilpiperazina presenta una inhibición significativa y de amplio espectro de la replicación del ADN de HAdV y HCMV. Además según los resultados biológicos obtenidos,

dos de estos compuestos suponen un punto de partida en el desarrollo de compuestos que inhiben específicamente la AVP.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral serán discutidos en detalle a continuación.

1. Caracterización estructural de los compuestos: espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La caracterización estructural de las nuevas sustancias obtenidas se ha realizado por sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM) (tanto de baja como de alta resolución) fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (DEPT, COSY, HSQC), que permiten asignar las señales que aparecen en sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

1.1. Primera generación de compuestos

En las Tablas 4 y 5 se presentan los datos de las señales más características de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos **10-26**.

En los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **10-26** además de las señales de los protones aromáticos (en el rango de 7-8 ppm) presentes en todos los compuestos, destacamos la del protón de la función urea, la del metino del anillo de piperazina, la de los tres protones del grupo metoxilo, la del grupo *terc*-butilo, y la del metilo del anillo de piperazina. La tabla 4 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	NH (urea)	CH (anillo piperazina)	OCH ₃	C(CH ₃) ₃	CH ₃ (anillo piperazina)
10	-	3,95-3,88	-	1,44	1,18
11	-	4,35-4,28	3,82	1,43	1,15
12	9,42	5,14-5,05	-	1,44	1,21
13	8,15-8,12	4,43-4,35	-	1,45	1,25
14	8,01	4,35-4,29	3,73	1,45	1,11
15	-	4,38-4,13	-	1,24	1,17
16	-	4,41-4,31	3,82	1,24	1,14
17	9,77	5,15-5,05	-	1,25	1,10
18	8,80	4,47-4,38	-	1,26	1,14
19	8,11	4,40-4,32	3,73	1,26	1,10
20	-	4,40-4,22	-	-	1,20
21	-	4,35-4,28	3,82	-	1,15
22	7,95-7,92	5,16	-	-	1,25
23	8,20	4,47-4,44	-	-	1,17
24	8,20	4,38	3,73	-	1,13
25	9,23	4,47	-	-	1,16
26	8,39	4,4-4,3	3,70	-	1,13

Tabla 4. Datos de ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) para los compuestos **10-26**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En todos los compuestos la señal del metino del anillo común de piperazina, se encuentra en torno a 4,0-4,5 ppm, salvo en los compuestos **12**, **17** y **22** (tioureas) en los que aparece a campo ligeramente más bajo, en torno a 5 ppm. En los compuestos con una función urea en el nitrógeno 1 de la piperazina se aprecia el protón del NH en torno a 9,0-8,5 ppm. La presencia del grupo metoxilo en el anillo aromático se confirma con el singulete a 3,8-3,7 ppm, que integra para tres protones (compuestos **11**, **14**, **16**, **19**, **21**, **24** y **26**). En todos los compuestos aparece la señal del metilo en posición 2 del anillo de piperazina en torno a 1,14 ppm.

En los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos **10-26** son características las señales de los dos grupos carbonilo presentes en estos compuestos, sobre el nitrógeno 1 (urea/tiourea o amida) y el nitrógeno 4 (amida), la del carbono cuaternario del grupo *terc*-butilo así como los metilo de dicho grupo, la del grupo metoxilo sobre el anillo aromático y la del metilo en el anillo de piperazina. La tabla 5 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	C=O (N1)	C=O (N4)	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	OCH_3	CH (anillo piperazina)	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	CH_3 (anillo piperazina)
10	168,3	151,4	79,8	-	47,9	28,6	15,7
11	160,8	155,1	79,8	55,9	48,2	28,5	15,6
12	181,3	154,5	79,6	-	51,8	27,9	14,7
13	155,3	154,3	79,7	-	47,3	28,6	15,6
14	156,0	155,5	79,5	55,8	46,9	28,6	15,4
15	177,1	168,1	51,1	-	48,8	28,7	15,8
16	177,1	168,3	51,5	55,8	48,4	27,4	15,9
17	182,3	154,5	52,5	-	48,2	28,6	15,6
18	176,9	154,4	51,3	-	48,2	28,6	15,7
19	177,7	155,7	51,1	55,9	48,4	28,7	15,6
20	171,2	156,8	-	-	47,9	-	15,9
21	171,2	155,1	-	55,9	47,8	-	15,6
22	182,7	155,3	-	-	52,4	-	15,6
23	166,0	154,5	-	-	47,9	-	15,6
24	170,8	155,8	-	55,9	47,1	-	15,5
25	159,5	154,1	-	-	46,9	-	15,4
26	155,9	155,3	-	55,7	47,2		15,4

Tabla 5. Datos de ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos **10-26**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En la Tabla 5 se observa que todos los compuestos presentan en torno a 155 ppm la señal atribuida al carbonilo amídico en el nitrógeno 4 de la piperazina. La señal que aparece a mayor desplazamiento químico (160-170 ppm) se atribuye al carbonilo en el nitrógeno 1, que está en algunos compuestos como una amida y en otros como urea, de ahí el rango de ppm. Los compuestos con grupo *terc*-butoxilo en 4 (**10-14**) presentan a 80 ppm la señal correspondiente al carbono cuaternario, mientras que en los compuestos con un grupo pivaloil en 4 (**15-19**) la señal de ese carbono cuaternario aparece en torno a 51 ppm. En todos estos compuestos la señal atribuida a los metilo de dichos grupos *terc*-butilo se observa a 28 ppm. Ninguna de estas señales se aprecia en los compuestos **20-26**, benzoil o benzofurano-2-carbonil derivados. A 56 ppm se aprecia la señal del grupo metoxilo en el anillo aromático. Señales presentes en todos los compuestos son la del metino del anillo de piperazina (en torno a 48 ppm) y la del metilo en posición 2 de dicho anillo, sobre 15 ppm.

1.2. Segunda generación de compuestos

En las Tablas 6 y 7 se presentan los datos de las señales más características de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos **27-41**.

En los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **27-41** además de las señales de los protones aromáticos (en el rango de 7-8 ppm) presentes en todos los compuestos, destacamos la del protón de la función urea, la del grupo metino del anillo de piperazina, la del grupo *terc*-butilo, y la del metilo del anillo de piperazina. La tabla 6 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	NH (urea)	CH (anillo piperazina)	C(CH ₃) ₃	CH ₃ (anillo piperazina)
27	8,60	4,29	1,40	1,09
28	8,86	4,30	1,40	1,08
29	9,29	4,29	1,44	1,08
30	8,41	4,33	1,44	1,15
31	8,91	4,36	1,44	1,11
32	8,65	4,43	-	1,14
33	8,91	4,45	-	1,15
34	9,02	4,42	-	1,12
35	8,59	4,42	-	1,14
36	9,37	4,40	-	1,19
37	8,38	4,40	-	1,19
38	8,25	4,40	-	1,19
39	8,40	4,38	-	1,15
40	8,15	4,38	-	1,15
41	8,54	4,44	-	1,14

Tabla 6. Datos de ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) para los compuestos **27-41**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En todos los compuestos se aprecia la señal del protón de la función urea en el nitrógeno 1 sobre 8-9 ppm y la señal del grupo metino del anillo común de piperazina se encuentra en torno a 4,4 ppm. Los compuestos **27-31**, *terc*-butoxi derivados presentan la señal de los tres metilos del grupo *terc*-butilo como un singulete a 1,4 ppm que integra para nueve protones. El compuesto **40**, el único con un grupo metoxilo en el anillo aromático, presenta a 3,79 ppm un singulete que integra para tres protones.

En los espectros de ¹³C-RMN de los compuestos **27-41** son características las señales de los dos grupos carbonilo presentes en estos compuestos, la del carbono cuaternario del grupo *terc*-butilo, la del metino de la

piperazina, la de los metilo del grupo *terc*-butilo y la del metilo en el anillo de piperazina. La tabla 7 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	C=O	C=O	$\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$	CH (anillo piperazina)	$\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$	CH_3 (anillo piperazina)
27	154,8	154,5	79,4	46,4	27,9	14,7
28	155,2	155,1	80,0	47,1	28,5	15,3
29	157,2	155,1	79,0	46,9	28,0	15,0
30	154,4	154,3	79,0	46,8	28,0	14,8
31	154,2	154,1	79,0	46,4	28,2	14,9
32	159,8	154,7	-	46,7	-	14,9
33	159,9	154,5	-	46,8	-	14,9
34	159,9	154,2	-	46,8	-	15,0
35	158,6	155,1	-	46,7	-	14,9
36	159,9	154,3	-	47,3	-	14,9
37	159,9	155,2	-	47,0	-	14,8
38	159,9	155,1	-	47,1	-	15,0
39	159,9	155,3	-	47,0	-	14,8
40	160,0	155,0	-	47,0	-	14,9
41	155,2	154,0	-	46,7	-	14,9

Tabla 7. Datos de ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos **27-41**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En la Tabla 7 se observa que todos los compuestos presentan en torno a 154-155 ppm las señales atribuidas a los dos carbonilos presentes. Los compuestos con grupo *terc*-butoxilo en 4 (**27-31**) presentan a 80 ppm la señal correspondiente al carbono cuaternario y a 28 ppm la señal atribuida a los metilo de dichos grupos *terc*-butilo. Ninguna de estas señales se aprecia en los compuestos **32-41** benzofurano-2-carbonil derivados. Señales presentes en

todos los compuestos son la del grupo metino del anillo de piperazina (en torno a 47 ppm) y la del metilo en posición 2 de dicho anillo, sobre 15 ppm.

1.3. Tercera generación de compuestos

En las Tablas 8 y 9 se presentan los datos de las señales más características de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos **46-65**.

En los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **46-65** además de las señales de los protones aromáticos (en el rango de 7-8 ppm) presentes en todos los compuestos, destacamos la del protón de la función urea, la del grupo metino del anillo de piperazina, la del grupo *terc*-butilo, y la de los tres protones del grupo metoxilo o metilo en el anillo aromático. La tabla 8 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	NH (urea)	CH (anillo piperazina)	OCH ₃ /CH ₃	C(CH ₃) ₃
46^a	6,65	5,1	-	1,41
47	8,77	5,47	-	1,35
48^a	6,50	5,10	-	1,40
49	8,68	5,47	-	1,35
50^a	6,55	5,10	-	1,40
51	9,41	5,39	-	1,36
52	8,39	5,41	-	1,33
53	9,01	5,48	-	1,35
54^a	6,08	5,08	3,75 (OCH ₃)	1,40
55^a	6,15	5,08	2,25 (CH ₃)	1,33
56	9,31	5,42	-	1,10
57	8,42	5,42	-	1,10
58	8,42	5,42	-	1,08
59	9,39	5,62	-	-
60	8,82	5,59	-	-

VI. DISCUSIÓN

Compuesto	NH (urea)	CH (anillo piperazina)	OCH ₃ /CH ₃	C(CH ₃) ₃
61	9,10	5,63	-	-
62	8,74	5,61	-	-
63	9,19	5,62	-	-
64	9,45	5,23	-	-
65	8,07	5,53	-	-

Tabla 8. Datos de ¹H RMN (500 MHZ, DMSO-d₆) para los compuestos **47-65**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. ^a Espectro adquirido empleando CDCl₃ como disolvente.

En todos los compuestos se aprecia la señal del protón de la función urea en el nitrógeno 1 sobre 8-9 ppm y la señal del grupo metino del anillo común de piperazina se encuentra en torno a 5-,0-5,5 ppm. Los compuestos **46-58**, *terc*-butoxilo o pivaloil derivados presentan la señal de los tres metilos del grupo *terc*-butilo como un singulete a 1,4 y 1,1 ppm respectivamente que integra para nueve protones. El compuesto **54**, el único con un grupo metoxilo en el anillo aromático, presenta a 3,75 ppm un singulete que integra para tres protones y el compuesto **55** el único con un grupo metilo en el anillo, presentando un singulete para tres protones a 2,25 ppm.

En los espectros de ¹³C-RMN de los compuestos **46-65** son características las señales de los dos grupos carbonilo presentes en estos compuestos, la del carbono cuaternario del grupo *terc*-butilo, la del metino de la piperazina, la de los metilo del grupo *terc*-butilo y la del grupo metoxilo o metilo en el anillo aromático. La tabla 9 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

VI. DISCUSIÓN

Compuesto	C=O	C=O	$\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$	CH (anillo piperazina)	$\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$	OCH_3/CH_3
46^a	154,8	154,3	80,5	58,6	28,3	-
47	154,9	154,4	79,1	53,1	27,9	-
48^a	154,8	154,4	80,6	58,1	28,3	-
49	158,4	156,5	79,1	53,1	27,9	-
50^a	154,4	154,3	80,5	58,5	28,3	-
51	154,5	154,4	79,1	53,8	27,9	-
52	154,6	153,7	79,1	53,1	27,9	-
53	154,7	153,5	79,1	54,1	27,9	-
54^a	154,8	154,5	79,4	53,2	27,8	55,1 (OCH ₃)
55^a	150,2	150,1	75,0	52,8	23,1	15,5 (CH ₃)
56	156,4	152,6	52,3	55,5	28,9	-
57	154,5	151,8	45,8	54,6	27,8	-
58	154,3	153,0	45,5	54,2	27,8	55,1 (OCH ₃)
59	159,3	154,3	-	54,1	-	-
60	159,3	154,8	-	53,4	-	-
61	159,3	154,7	-	53,9	-	-
62	159,3	154,0	-	53,7	-	-
63	159,3	154,4	-	53,8	-	-
64	159,3	154,4	-	54,8	-	-
65	159,4	154,3	-	55,1	-	-

Tabla 9. Datos de ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) para los compuestos **46-65**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. ^a Espectro adquirido empleando CDCl₃ como disolvente.

En la Tabla 9 se observa que todos los compuestos presentan las dos señales atribuidas a los dos carbonilos presentes. Los compuestos con grupo *terc*-butoxilo en 4 (**46-55**) presentan alrededor de 80 ppm la señal correspondiente al carbono cuaternario, dicha señal se aprecia sobre 45-50 ppm, los metilo de dichos grupos *terc*-butilo aparecen a 28 ppm. Ninguna de estas señales se aprecia en los compuestos **59-65** benzofurano-2-carbonil

derivados Señal presente en todos los compuestos es la del metino del anillo de piperazina (en torno a 53-55 ppm).

1.4. Potenciales inhibidores específicos de la AVP

En las Tablas 10 y 11 se presentan los datos de las señales más características de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos **68-72**.

En los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **68-72** además de las señales de los protones aromáticos (en el rango de 7-8 ppm) presentes en todos los compuestos, destacamos las señales del protón del nitrógeno indólico, la del protón de la función urea y la del metino del anillo de piperazina. La tabla 10 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	NH (indol)	NH (urea)	CH (anillo piperazina)
68	-	9,12-9,06	5,0-4,7
69	-	8,46-8,30	5,57-5,44
70	12,2	9,14-9,05	5,76
71	12,2	8,62	5,68
72	-	-	5,0

Tabla 10. Datos de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos **68-72**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En todos los compuestos la señal del metino del anillo común de piperazina, se encuentra en torno a 5-6 ppm. Salvo el compuesto **72**, el resto poseen una función urea sobre el nitrógeno 1, apareciendo el protón de la misma en torno a 8,5-9,0 ppm. En los dos compuestos que poseen el grupo indol, **70** y **71**, se observa la señal del protón a 12,2 ppm. La señal del metilo

de la metilcetona, compuestos **68** y **70** aparece coincidiendo con la señal residual del disolvente, 2,5 ppm por lo que no se incorpora en la tabla.

En los espectros de ^{13}C -RMN son características las señales de los diferentes grupos carbonilo presentes en estos compuestos, de dos cetonas diferentes, un grupo metilcetona y un cetoindol, de amida sobre el nitrógeno 4 y de urea sobre el nitrógeno 1. La tabla 11 recoge los datos de desplazamiento químico para estas señales (δ).

Compuesto	C=O (metilcetona)	C=O (cetoindol)	C=O (amida en N4)	C=O (urea en N1)
68	196	-	164	154
69	-	-	166	154
70	196	185	166	154
71	-	185	166	154
72	-	-	164	-

Tabla 11. Datos de ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) para los compuestos **68-72**. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

En la Tabla 11 se observa que todos los compuestos tienen el nitrógeno 4 acilado (señal en torno a 166 ppm). El compuesto **72** no posee más grupos carbonílicos en su estructura, mientras que los demás, **68-71** poseen también la función urea en el nitrógeno 1 (señal a 154 ppm). El compuesto **68** presenta además la agrupación metilcetona (señal a 196 ppm) mientras que el compuesto **71** posee el cetoindol (señal a 185 ppm). El compuesto **70** es el único que presenta los 4 tipos de grupos carbonilo en su estructura, una urea en el nitrógeno 1, una amida en el nitrógeno 4 y las dos cetonas, la metilcetona y el cetoindol. En los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos **68** y **70** se aprecia también a 26,3 ppm la señal debida al metilo del grupo metilcetona que no aparece en los otros.

2. Inhibición de la infección de HAdV por los derivados de 4-Acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina

En el campo de la química médica, los derivados de piperazina han demostrado ser compuestos que presentan importantes propiedades antivirales [94,101,131-133]. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto que el compuesto **2**, derivado de una librería 2-piperazinona, presentaba una importante actividad anti-HAdV y toxicidad reducida, cuyo mecanismo de acción estaba dirigido a la inhibición de la replicación del ADN viral [108]. A partir de esta molécula precursora se inició un proceso de optimización mediante modificaciones estructurales para obtener tres nuevas generaciones de compuestos derivados de 4-asil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina y 4-asil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina. Atendiendo a la estructura del compuesto **2**, los ensayos de relación estructura-actividad confirmaron que su alta actividad antiviral estaba relacionada con la presencia de un anillo central de 2-piperazinona conjuntamente con un radical de 2-benzofuranilo acilando al nitrógeno 4 y un grupo etilo en posición 6 del anillo de 2-piperazinona. En este contexto, de los seis compuestos derivados de piperazina identificados en esta tesis como los que presentan mayor actividad anti-HAdV, cinco poseen el radical 2-benzofuranilo acilando el nitrógeno 4 de la piperazina. En concordancia con estudios previos, la presencia de este grupo aumenta la actividad antiviral de diversos compuestos de manera considerable y sin afectar a la toxicidad [94,131]. Sin embargo, aunque la presencia de un grupo etilo en los derivados de 2-piperazinona había demostrado presentar mayor actividad frente a HAdV que sustituyentes 2-feniletilo, ningún derivado con grupos metilo o fenilo se habían ensayado previamente [108].

2.1. Primera generación

Para la síntesis de la primera generación de compuestos se empleó el precursor 2-metilpiperazina. Se escogió como esqueleto central común a nuestros análogos la 2-metilpiperazina porque se trata de un residuo presente

en nuevos compuestos que actualmente se están evaluando frente a otros tipos de virus como puede ser el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [134] o de fiebres hemorrágicas tropicales [135], por poseer en la posición contigua al nitrógeno un grupo metilo (el compuesto líder **2** posee un grupo etilo) y por tratarse de un producto comercial y asequible. Los resultados obtenidos en esta generación mostraron que los cuatro compuestos más activos (**12**, **13**, **22** y **25**) son los que poseen un grupo urea o tiourea unidos al nitrógeno 1 con un grupo electrón-atrayente (NO_2), y el grupo acilo unido al otro nitrógeno es un uretano o 2-benzofuranilo. La incorporación del grupo carbonilo al nitrógeno 1 en esta primera generación se realiza mediante funciones amida y urea / tiourea, con objeto de evaluar qué función orgánica resultaba crítica para la actividad biológica, observándose que los compuestos más activos poseían una función urea o tiourea. De los compuestos más activos, los productos **12** y **22** tuvieron que descartarse como modelo para la síntesis de la segunda generación de compuestos dada la citotoxicidad asociada al grupo tiourea. Varios estudios reflejan también la citotoxicidad que producen diversos compuestos orgánicos con funciones tioureas sobre diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos [136-139]. Sin embargo, la preparación y evaluación de estos productos se fundamentó en que varios productos derivados de tioureas han demostrado ser potentes inhibidores de la familia de los herpesvirus, virus de doble cadena de ADN al igual que HAdV [140-142].

2.2. Segunda generación

Basado en la información obtenida de la librería de la primera generación de inhibidores derivados de metilpiperazina, se concluyó que para la actividad de los compuestos la presencia de un grupo uretano o 2-benzofuranilo en el nitrógeno 1 eran preferibles, así como una función urea portando un anillo de fenilo con grupos electrón-atrayentes. Por tanto en la segunda generación de compuestos se estudiaría el efecto en la actividad de distintos sustituyentes electrón-atrayentes en el anillo de fenilo de la función urea así como su posición manteniendo el grupo *terc*-butoxilo o 2-benzofuranilo acilando el nitrógeno 1. Los compuestos más activos de esta generación mostraron

porcentajes de inhibición de la formación de placas de HAdV5 entre el 91 y 100% con distintos grupos electrón-atrayentes.

En un intento por generar *terc*-butoxicarbonil derivados que aumentaran la actividad del compuesto **13** (primera generación) se ensayaron distintas posiciones y grupos electrón-atrayentes sobre el anillo fenilo. Desgraciadamente, ninguno de los sustituyentes Cl, CF₃ o NO₂ (posición *orto*-) mejoraron su actividad antiviral. Por otro lado, los compuestos **30** y **31** mostraron una potente actividad antiviral, a la que sin embargo iba también asociada una elevada citotoxicidad. Es importante mencionar que ambos poseen un anillo de fenilo disustituido (Cl y CF₃). En este sentido, algunos trabajos muestran como la disustitución del grupo fenilo de la región C-terminal del compuesto está relacionado con una ausencia total de actividad anti-HAdV y elevada citotoxicidad frente a diferentes tipos celulares [143,144].

Los ensayos sobre los compuestos derivados de 2-benzofuranilo demostraron que la presencia de sustituyentes sobre el anillo de fenilo es fundamental para que los compuestos presenten actividad antiviral (el compuesto **41** con el anillo de fenilo sin sustituir no es activo). Además, de entre los grupos electrón-atrayentes ensayados, la presencia de un grupo F en posición *para*- mostró el mejor resultado de actividad antiviral con reducida citotoxicidad (compuesto **35**). El compuesto **36** se sintetizó en un intento de obtener un análogo al **25** (primera generación) mediante el cambio en el patrón de sustitución del anillo de fenilo, de posición *para* (compuesto **25**) a *orto*- en el compuesto **36**, obteniéndose un compuesto con similar actividad y con CC₅₀ aumentada (de 51,1 a 202,6 µM). Para otros grupos electrón atrayentes (F, Br) localizados en posición *orto*- no se detectó actividad anti-HAdV significativa (compuestos **37** y **38**).

2.3. Tercera generación

Para sintetizar los compuestos de la tercera generación de inhibidores se preservaron las características estructurales de los compuestos más activos de

la segunda generación (grupo *terc*-butoxilo o 2-benzofuranilo acilando al nitrógeno 4 y un anillo de fenilo con grupos electrón atrayentes unido a una función urea sobre el nitrógeno 1) y se procedió a modificar el último punto de variabilidad estructural en nuestro esqueleto general, el sustituyente en posición 2 del anillo de piperazina. De esta forma se sintetizaron los compuestos de la tercera generación, con un fenilo en posición 2 del anillo empleando 2-fenilpiperazina como producto de partida.

En general, los compuestos obtenidos tras esta tercera ronda de optimización presentaron una alta actividad antiviral, ya que tan sólo 2 de los 20 que constituyen la familia dieron un porcentaje de inhibición < 70%. Entre los derivados de *terc*-butoxilo (compuestos **46-55**) sólo el compuesto **46** (grupo NO₂ en *para*-) mostró alta actividad (96%) en ausencia de citotoxicidad (CC₅₀ 161 µM); mientras que los grupos Cl, CF₃, F, y CN en esa posición no aumentaron significativamente la actividad (compuestos **47-50**), siendo algunos citotóxicos (Cl y CF₃).

Cuando el grupo 2-benzofuranil está presente, los valores de actividad de los compuestos con el anillo de fenilo *para*- sustituido fueron, en general, mayores que los análogos *terc*-butoxil derivados. En este sentido, cabe destacar la síntesis del NO₂ derivado como un nuevo compuesto activo (**59**) y con mayor actividad antiviral (del 96 al 100% de inhibición) que el compuesto **46**. Además, los Cl y CN derivados (**60** y **63**), presentaron una alta actividad antiviral y una notable disminución de la citotoxicidad respecto a los análogos derivados de *terc*-butoxilo (**47** y **50**). Los derivados CF₃ y F (**61** y **62**) aumentaron la actividad anti-HAdV de los productos **48** y **49** (análogos *terc*-butoxi derivados), sin embargo todavía muestran una citotoxicidad significativa por lo que no fueron seleccionados. El *orto*-NO₂ derivado (**64**) resultó muy activo y no citotóxico, mejorando este último aspecto respecto al compuesto **51** (*terc*-butoxi derivado) que presentaba ligera citotoxicidad: Además el 2-benzofuranil derivado disustituido **65** fue preparado como análogo del **52** presentando también alta actividad inhibitoria pero en este caso, baja citotoxicidad.

El conjunto de resultados expuestos hasta el momento indican que para los derivados de 2-fenilpiperazina, la presencia de un grupo 2-benzofuranilo aumenta la actividad antiviral, y en algunos sustituyentes (NO₂, Cl y CN en posición *para*-, NO₂ en posición *orto*-, y Cl y CF₃ en el anillo de fenilo disustituido) aumenta la CC₅₀, produciendo compuestos más activos y menos citotóxicos.

En base a lo anteriormente expuesto se seleccionaron para la caracterización en detalle de su mecanismo de acción las 2-fenilpiperazinas **46**, **59**, **60**, **63**, **64** y **65** por ser las más activas en función de su actividad antiviral en ensayo en placa y su baja citotoxicidad.

3. Impacto en la entrada de HAdV

El proceso de entrada de los HAdV al interior celular requiere atravesar la membrana plasmática mediante su inclusión en endosomas, la liberación de la partícula viral al citoplasma celular seguida de su transporte por medio del sistema microtubular hasta la envuelta nuclear, y en última instancia liberar el ADN viral al núcleo celular a través del complejo del poro nuclear [40]. Algunos investigadores han demostrado que el desarrollo de inhibidores derivados de piperazina pueden bloquear el proceso de entrada de virus en la célula hospedadora. En el caso del VIH se observa que actúan como antagonistas de los correceptores CCR5 celulares, e impiden la entrada del virus a la célula [145,146]. En otros casos como en el de los arenavirus la actividad antiviral de estos compuestos se asocia al bloqueo del proceso de fusión de membranas, necesario durante la entrada al hospedador [135]. Por tanto, ya que el acceso del HAdV a la célula consiste en una sucesión de eventos altamente coordinados, mediante los ensayos realizados en este proyecto pudimos analizar si algunos de los compuestos estudiados interferían en alguno de estos procesos, lo que se detectaría como una disminución de la expresión de GFP asociada a HAdV5 en el núcleo celular.

Los resultados del ensayo de entrada obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento con las 2-fenilpiperazinas inhibe la expresión del transgen de HAdV5-GFP de manera significativa a diferentes niveles dependiendo del compuesto, pero esta determinación no nos proporciona información acerca de su posible mecanismo de acción. De igual manera, la molécula precursora **2** inhibía la expresión del transgen GFP, pero diversos experimentos demostraron que no interfería en los procesos de unión a los receptores celulares, internalización de la partícula viral o la disrupción del endosoma [108].

Los porcentajes de inhibición de los ensayos de entrada de las tres generaciones obtenidas en este trabajo varían notablemente según las características particulares de cada compuesto, y pese a que informan sobre la capacidad de los compuestos de inhibir la infección a una elevada multiplicidad de infección, los ensayos de cuantificación de formación de placas de infección de HAdV proporcionaron mayor información sobre el impacto de la actividad anti-HAdV de los compuestos, ya que a diferencia del ensayo de entrada, en estos experimentos, los HAdV pueden completar su ciclo infectivo y generar nuevas partículas víricas durante siete días.

Después del escape endosomal mediado por la proteína VI, las cápsidas de HAdV parcialmente desensambladas son transportadas a la membrana nuclear mediante la red microtubular [147]. En ese momento, el genoma del HAdV se importa al núcleo junto a la proteína VII, a través del complejo del poro nuclear [148]. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que ninguna de las 6 fenilpiperazinas inhibía el proceso de entrada del virus hasta la liberación del ADN viral al núcleo de la célula, ya que tras una infección sincronizada, el ADN de HAdV en todas las condiciones ensayadas se acumulaba en el núcleo de la célula hospedadora al mismo nivel que los controles no tratados. Por consiguiente, nuestros resultados indican que estamos midiendo de manera específica el ADN de HAdV que ha alcanzado el núcleo y que los compuestos no alteran ninguna de las etapas previas que conducen a su acceso al núcleo celular. Sin embargo, como ocurría con el compuesto **2** no podemos excluir la posibilidad de que los compuestos

restringan la llegada del genoma del virus a la localización nuclear adecuada o que de alguna manera interfieran la cromatización del mismo [36], paso fundamental para iniciar los procesos posteriores implicados en la replicación viral.

4. Impacto en la replicación de HAdV

Existen diversos antivirales como maribavir entre otros, que interfieren en distintas etapas del ciclo replicativo en virus de ADN [149-152]. En el caso de HAdV, a través del cribado de alto rendimiento de pequeñas moléculas se ha identificado el compuesto A3, cuya acción interrumpe la biosíntesis de pirimidina, necesaria para generar el uracilo que resulta esencial para la replicación viral [153].

En el presente trabajo se observó que los compuestos **46**, **59**, **60**, **63** y **64** inhibían claramente la replicación del ADN de HAdV5 y no afectaban a la transcripción del gen temprano E1A de HAdV5 a las 6 horas postinfección. Previamente a la replicación del ADN de HAdV, ocurre la transcripción del gen E1A mediante la RNA polimerasa II celular en el promotor E1A [154]. La proteína E1A promueve su propia transcripción, necesaria para la expresión de los genes tempranos E1B, E2, E3 y E4 en diferentes promotores para que ocurra la replicación del ADN de HAdV.

La disminución significativa en la producción de nuevas partículas virales (reducción de la progenie viral) en presencia de los 6 derivados de 2-fenilpiperazina refuerzan los resultados obtenidos sobre efecto inhibitorio que causan los compuestos en la replicación del HAdV. Además, el efecto antiviral de estos derivados no parece ser específico de la especie C de HAdV (HAdV 5), ya que presentaban unos valores de inhibición en ensayo en placa similares a los obtenidos en la infección causada por las especies B de HAdV (HAdV 16) e incluso superiores en el caso de otra especie de virus ADN diferente como es el HCMV.

5. Impacto en la replicación de HCMV

Dado que otros compuestos como los análogos de nucleótidos y nucleósidos (ej. Cidofovir) han demostrado tener una amplia actividad contra múltiples virus de doble cadena de ADN incluyendo HCMV y HAdV, mediante la inhibición de las ADN polimerasas [2], analizamos la posibilidad de que los compuestos bloquearan la replicación del ADN de HCMV. Los resultados evidenciaron una potente inhibición de la replicación de HCMV en presencia de los 6 derivados de fenilpiperazina, lo que sugiere que poseen un mecanismo de acción de amplio espectro que puede tener como diana una proteína específica que podría ser viral o celular.

El compuesto 65 parece no afectar a la replicación del ADN de HAdV5 ni la transcripción de ARNm, pero ha mostrado una importante inhibición de la replicación de HCMV; por tanto su mecanismo de acción frente al HAdV debería estar implicado en etapas posteriores del ciclo replicativo, como la síntesis de proteínas estructurales, ensamblaje del virión o liberación de nuevas partículas virales.

6. Evaluación de la inhibición de los compuestos derivados de 2-fenilpiperazina sobre la polimerasa de phi29 (ϕ 29)

Para estudiar una posible diana viral del mecanismo de amplio espectro manifestado por los compuestos, estudiamos si la presencia de los mismos afectaba la actividad *in vitro* de la ADN polimerasa del fago ϕ 29, una ADN polimerasa que presenta una alta homología comparada con las de HAdV y HCMV [155]. Estas tres polimerasas pertenecen a la familia B de polimerasas de ADN, que emplean la proteína pTP como iniciador de la replicación [156]. En este trabajo, la presencia de los compuestos **59**, **64** y **65** disminuyó la actividad *in vitro* de la ADN polimerasa de ϕ 29. Dado que los compuestos **59** y **64** ejercían una marcada inhibición de la replicación de HAdV su mecanismo de acción parece estar involucrado en la inhibición directa de la actividad de la polimerasas de HAdV y HCMV, dada la alta homología estructural y funcional

con la de $\phi 29$. Estos resultados contrastan con los obtenidos para los compuestos **46**, **60** y **63** ya que aunque impiden la replicación de HAdV y HCMV, no bloquearon significativamente la actividad de la polimerasa de $\phi 29$. Por consiguiente, estos compuestos podrían interaccionar con otras proteínas virales esenciales relacionadas con el proceso de replicación, tales como la pTP o la DBP [35].

Sorprendentemente, el compuesto **65**, que ha demostrado inhibir únicamente la replicación de ADN de HCMV, afecta a la actividad de la ADN polimerasa de $\phi 29$. Las ADN polimerasas de HCMV, HAdV y $\phi 29$ comparten homología de secuencias de aminoácidos conservados en diversas regiones, entre las que se encuentra el centro catalítico de la enzima, aunque la organización estructural de estos residuos varía considerablemente de unas ADN polimerasas a otras [157,158]. Esta variación en la disposición de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima, y la presencia de dos sustituyentes sobre el grupo fenilo del compuesto **65** podría suponer una unión específica del mismo a las ADN polimerasas de HCMV y $\phi 29$, y no así a la del HAdV.

Por otra parte, Ying B. *et al.*, demostraron en un estudio con la ADN polimerasa purificada del HAdV5 (HAdVpol), que parte del efecto anti-HAdV del ganciclovir residía en inhibir la incorporación de aminoácidos en la fase de elongación de la HAdVpol, y por tanto su actividad [159]. Este ensayo podría servir para caracterizar en mayor profundidad los resultados obtenidos en esta tesis mediante un estudio directo del efecto inhibitor de los compuestos de 2-fenilpiperazina sobre la HAdVpol.

7. Evaluación de nuevos inhibidores específicos de la proteasa del HAdV (AVP): síntesis y determinación estructural

La AVP es una proteasa de cisteína de 23 kDa que se activa dentro del virión en formación [115,129], de tal manera que puede procesar múltiples copias de las proteínas precursoras empleadas en el ensamblaje del virus [24]. Sólo entonces las partículas víricas son infecciosas. Por tanto, se trata de una

proteína esencial y necesaria para la formación de virus maduros y que representa una importante diana terapéutica, puesto que no posee proteínas homólogas en humanos [160].

En este trabajo nos propusimos el diseño de inhibidores selectivos de la AVP ya que pueden suponer un tratamiento efectivo contra las infecciones causadas por HAdV. Gran parte del diseño de este tipo de inhibidores se ha centrado en considerar la necesidad de que posean un centro electrofílico que pueda formar enlaces covalentes con el centro activo de la proteasa [122,123]. Además, este centro electrofílico debería estar contenido en un esqueleto capaz de reconocer el centro activo del enzima.

El diseño de los compuestos de este trabajo con potencial actividad contra la AVP se centró en tres características principales: i) La primera es que varios investigadores han demostrado que diversos compuestos derivados de piperazina pueden inhibir selectivamente la actividad de proteasas de cisteína de diversos patógenos e incluso revertir la enfermedad que causan [161-163]. Por ello decidimos emplear como material de partida el esqueleto central de 2-fenilpiperazina, dada la potencia antiviral que ha demostrado frente a HAdV; ii) En segundo lugar es importante tener en cuenta que la presencia de grupos electrofílicos en estos compuestos pueden favorecer la interacción con el centro activo de la enzima, generalmente mediante enlaces covalentes de reversibilidad variable con el residuo de azufre de la cisteína 122 del centro catalítico de la AVP [120]. Los compuestos generados en este trabajo poseen dos tipos de centros electrofílicos buscando favorecer esas interacciones, principalmente en forma de grupo cetona, ya que se ha demostrado su importancia en la estructura de inhibidores irreversibles de las proteasas de cisteína [164-166]; iii) Por último, se generó diversidad química en la estructura de los compuestos mediante la incorporación de diferentes grupos funcionales en los nitrógenos 1 y 4 de la 2-fenilpiperazina. Entre estos se incluían otros grupos con centros electrofílicos además del grupo cetona, como grupos acilo α,β -insaturados para intentar incrementar las interacciones del centro catalítico de la proteasa y también grupos isocianatos con sustituyentes del tipo electrón-atrayentes que habían demostrado una elevada potencia anti-HAdV.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de los 5 nuevos compuestos (**68-72**) derivados de 2-fenilpiperazina y su evaluación como inhibidores específicos de la AVP del HAdV.

7.1. Análisis de la expresión de los genes tempranos y tardíos de HAdV

En esta parte del trabajo pretendíamos evaluar si la presencia de los compuestos afectaba a los niveles de expresión de genes tempranos y tardíos de HAdV. Como ninguno de los compuestos derivados de 2-fenilpiperazina que habían presentado mayor actividad anti-HAdV afectaban a la transcripción del gen temprano *E1A* de HAdV5, para el estudio de expresión los genes tempranos se analizaron los efectos sobre el gen *E4orf3*, que codifica para una proteína de 11 kDa identificada en la región temprana E4 del genoma de HAdV [167,168]. El producto del gen *E4orf3* tiene como diana la isoforma II de la proteína promielocítica de la leucemia (PML), y como resultado reorganiza las proteínas celulares y virales en torno a los centros de replicación del virus [169]. Esto ha sido comprobado por otros investigadores, ya que la sobreexpresión de las proteínas PML inhibe el proceso de reorganización causado por *E4orf3*, y por consiguiente la replicación viral [170,171].

De los resultados obtenidos en este experimento cabe destacar que ninguno de los compuestos que inhibieron la replicación en HAdV5 (**46**, **59**, **60**, **63** y **64**) mostraron una alteración significativa en la expresión del gen *E4orf3*, y por tanto sus mecanismos de acción se deben a la acción directa sobre la ADN polimerasa de HAdV (**59** y **64**) o la inhibición de otras proteínas involucradas en la replicación viral.

El análisis de correlación entre la expresión de genes tempranos y tardíos de HAdV pusieron de manifiesto que los compuestos **32**, **54** y **60** ejercían una inhibición específica de expresión de los genes tardíos, y que se

manifestó en una menor detección de proteínas estructurales de la cápsida de HAdV.

En este análisis también se observó que en presencia de los compuestos **13** y **70**, pese a no inhibirse específicamente la expresión de los genes tempranos o tardíos de HAdV, las proteínas tardías de HAdV manifestaron unos niveles elevados en la intensidad del marcaje. Una posible explicación a este fenómeno es que estos compuestos podrían estar aumentando la expresión de la proteína tardía L4-22k, encargada de suprimir la expresión de los genes tempranos [172], y por tanto acelerarían la supresión de estos genes sin afectar a la fase de expresión de las proteínas tardías.

7.2.Efecto de los compuestos sobre la degradación de la red de citoqueratina celular

Se ha comprobado que la AVP emplea un cofactor no viral *in vivo* [173]. Durante la infección de HAdV, las redes de actina, citoqueratina, tubulina y vimentina que conforman el citoesqueleto celular sufren cambios dramáticos [174]. En la fase tardía de la infección, la citoqueratina 18 es escindida por la AVP en dos secuencias de corte específicas, lo que conduce a la destrucción de la red de citoqueratina celular [24]. Este proceso conlleva la destrucción de las proteínas que conforman el citoesqueleto de la célula y promueve la lisis celular necesaria para la liberación de la nuevas progenie de partículas virales [112].

Los resultados obtenidos en la presente tesis han permitido identificar los compuestos **65**, **68**, **70** y **71** como potenciales inhibidores específicos de la actividad de la AVP, puesto que previenen de la degradación de la red de citoqueratina causada por la AVP.

Los compuestos **70** y **71** no mostraron efectos inhibitorios sobre la expresión de genes tempranos (E4orf3) ni tardíos (proteínas estructurales). El compuesto **68** presentó una marcada inhibición en la expresión de los genes

tardíos (80%) mientras que el **65** lo hace también pero de forma moderada (39%). Los compuestos **70** y **71**, al estar aumentando la intensidad del marcaje de la citoqueratina celular en células infectadas y no tener su diana de acción en las fases tempranas o tardías de expresión génicas del virus, podrían suponer potencialmente inhibidores específicos de la AVP. Sin embargo, y como se ha comentado en el apartado anterior, no puede excluirse la posibilidad de que el mecanismo de acción del compuesto **70** pueda estar afectando la expresión de la proteína L4-22k.

Atendiendo a la estructura química de los compuestos **70** y **71** ambos presentan ciertas características comunes. En los dos compuestos el nitrógeno 4 se encuentra acilado con un grupo cetoindol, y sobre el nitrógeno 1 una función urea con anillo de fenilo con una función metilcetona en *para*- (**70**) o un fenilo disustituido (**71**). Además, la presencia de diversos grupos cetonas (centros electrofílicos) podrían estar favoreciendo las interacciones con el centro activo de la proteasa. En este sentido, Wang T. *et al.*, demostraron que la incorporación de sustituyentes indol en estructuras de piperazina aumenta notablemente la potencia antiviral de compuestos frente a VIH [103,175]. Además algunos estudios han probado que es un grupo químico eficaz teniendo como diana proteasas de cisteína, justificando así en parte la potente actividad que presenta frente a diversos patógenos [176,177].

8. Cristalización de la estructura del complejo AVP-pVlc-ADN

La unión del complejo AVP-pVlc al ADN viral conforma la estructura ternaria AVP-pVlc-ADN, que es la forma más activa de la enzima [114,118,119]. De esta manera pueden procesarse las proteínas necesarias para la maduración de la partícula vírica, y para ello el complejo AVP-pVlc se desliza sobre el ADN viral de manera unidimensional, con objeto de alcanzar y procesar sus sustratos que se encuentran también unidos al ADN [24,117,178]. Pese a que la obtención de la estructura cristalina del complejo AVP-pVlc ha permitido caracterizar ampliamente la enzima desde el punto de vista estructural, aún no ha conseguido resolverse la de la estructura de AVP-pVlc-

ADN. La cristalización de este complejo resulta imprescindible para conocer el funcionamiento de la AVP a nivel molecular y desentrañar la estructura, mecanismos y aminoácidos implicados en el deslizamiento sobre el ADN que permite la formación de partículas virales infecciosas, así como para un diseño más preciso de potenciales antivirales que tengan como diana de acción este complejo funcional.

Como primer paso para tratar de resolver la estructura AVP-pVlc-ADN en este trabajo, se establecieron las condiciones de cristalización necesarias para la obtención de la estructura cristalina AVP-pVlc. Esta estructura cristalina ya fue determinada por primera vez por Mangel *et al.* en 1999 [115] con una resolución de 2,6 Å que pudo mejorar notablemente unos años después a 1,6 Å, gracias al empleo de un potente sincrotrón de rayos X [129]. Comparando la estructura obtenida en este trabajo con la adquirida por Mangel *et al.* en 1999, la resolución ha mejorado de 2,6 Å a 2,1 Å y el R_{free} ha disminuido en un 4% (PDB:5FGY). Respecto al complejo cristalino de 1,6 Å analizado en el sincrotrón, la estructura que hemos obtenido presenta una menor resolución (2,1 Å), pero ambas presentan características similares en los datos estadísticos de refinamiento, indicativo de la calidad de los cristales obtenidos. Además de establecer las condiciones experimentales como base de los ensayos de cristalización para obtener el complejo AVP-pVlc-ADN, la estructura cristalina AVP-pVlc puede emplearse en ensayos para obtener complejos de unión proteína-inhibidores [179]. Los cristales de proteínas generalmente presentan canales a través de los cuales pueden difundir los inhibidores hasta el interior de la estructura cristalizada [180]. Así, mediante la técnica de difracción de rayos X podría obtenerse información sobre el mecanismo y lugar de unión específicos a través de los cuales ejercen su acción los inhibidores a la AVP.

Los ensayos de cristalización desarrollados en esta tesis no permitieron obtener el complejo trimérico formado por AVP-pVlc-ADN, pero la presencia de ADN viral de doble cadena de 12 pb junto con el complejo AVP-pVlc, dió lugar a estructuras cristalinas en forma de “agujas”. Es importante destacar que la presencia de estructuras en forma de “aguja” se encuentra en concordancia

con los datos experimentales que muestran que complejos AVP-pVlc se unen con valores de K_d fisiológicamente relevantes (2,9 nM) a estructuras de ADN de 12 pb [119,178]. Esto indica probablemente que en el interior de los cristales se encuentra el ADN de 12pb y que este tamaño del ADN es fundamental para el empaquetamiento y formación de la estructura cristalina de AVP-pVlc-ADN. Las condiciones óptimas para la obtención de los cristales podrían obtenerse mediante ligeras modificaciones como la reducción de las concentraciones de la proteína o precipitante, o quizás sea necesario aumentar ligeramente la acidificación del precipitante, debido a la naturaleza de las interacciones polares entre el esqueleto del ADN cargado negativamente y las cargas positivas de las cadenas laterales del mismo [181].

VII. CONCLUSIONS

- 1) For 2-phenylpiperazine derivatives the presence of a benzofuran-2-carbonyl group contributes to increase the antiviral activity.
- 2) All compounds possessing a di-substituted phenyl ring showed high cytotoxicity, except for 2-phenylpiperazine derivatives having a benzofuran-2-carbonyl group.
- 3) For 4-acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives the substitution of phenyl ring with electron-withdrawing NO₂, Cl and CN at the *para*- position, NO₂ at the *ortho*- position, and both Cl and CF₃ increases the antiviral activity and the CC₅₀, leading to more potent and safer compounds.
- 4) For benzofuran-2-carbonyl derivatives, the presence of substituents on the phenyl ring is needed for antiviral activity.
- 5) 2-Phenylpiperazines **46**, **59**, **60**, **63**, and **64** have proven to be significant and broad-spectrum inhibitors of DNA replication both in HAdV (families C and B) and HCMV.
- 6) 2-phenylpiperazine **65** has demonstrated significant broad antiviral activity against HAdV and HCMV, but its inhibitory activity must take place later after DNA replication.
- 7) 2-Phenylpiperazines **46**, **59**, **60**, **63**, **64** and **65** showed overall reductions in the viral progeny for HAdV5 and HAdV16 respect to the reductions obtained with molecule 2, which justify the work carried out to optimize the anti-HAdV activity of this compound 2.
- 8) Based on the inhibition of HAdV and HCMV DNA replication and the ϕ 29 polymerase based assay, compounds **59** and **64** block HAdV replication targeting the HAdV DNA polymerase.

- 9) The crystal structure of AVP-pVlc complex was determined at high resolution (2,1 Å) providing a good structure foundation for future drug discovery developments.
- 10) The obtained structures in the AVP-pVlc-DNA crystallization complex assays, with a 12-mer DNA strand, suggests that there could be DNA in the crystals and that this particular length of DNA is important for crystal packing and formation.
- 11) 2-Phenylpiperazines **70** and **71** show brighter cytokeratin staining in the infected cells than in the non-infected cell and they have no effect on early or late gene expression, representing clear candidates to specifically target the AVP.

VIII. ANEXO

1. Relación de productos sintetizados

1.1. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina: primera generación (10-26)

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
10	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-(4-nitrobenzoyl)piperazina	
11	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-(4-metoxibenzoyl)piperazina	
12	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminotiocarbonil]piperazina	
13	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
14	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]piperazina	
15	2-Metil-1-(4-nitrobenzoyl)-4-pivaloilpiperazina	
16	2-Metil-1-(4-Metoxibenzoyl)-4-pivaloilpiperazina	
17	2-Metil-1-[(4-nitrofenil)aminotiocarbonil]-4-pivaloilpiperazina	
18	2-Metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]-4-pivaloilpiperazina	

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
19	2-Metil-1-[(4-Metoxifenil)aminocarbonil]-4-pivaloilpiperazina	
20	4-Benzoil-2-metil-1-(4-nitrobenzoil)piperazina	
21	4-Benzoil-2-metil-1-(4-metoxibenzoil)piperazina	
22	4-Benzoil-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminotiocarbonil]piperazina	
23	4-Benzoil-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
24	4-Benzoil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
25	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
26	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	

Tabla 12. Primera generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina (compuestos 10-26).

1.2. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina: segunda generación (27-41)

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
27	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
28	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-[(4-trifluorometilfenil)aminocarbonil]piperazina	
29	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-metil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
30	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
31	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(4-cloro-3-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
32	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
33	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-metil-1-[(4-trifluorometilfenil)aminocarbonil]piperazina	
34	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-cianofenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
35	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-fluorfenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	

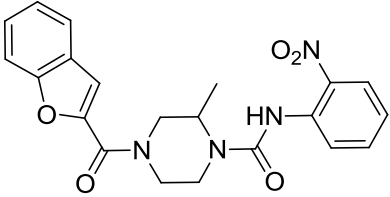
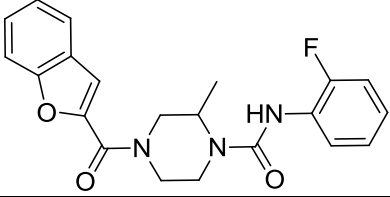
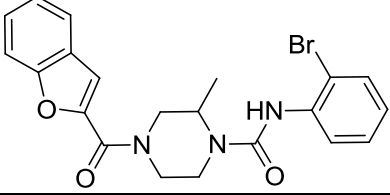
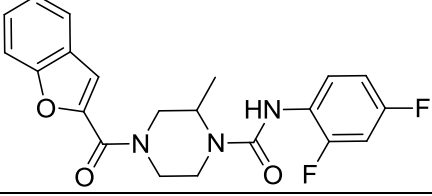
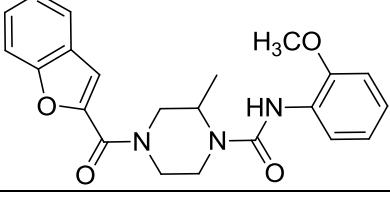
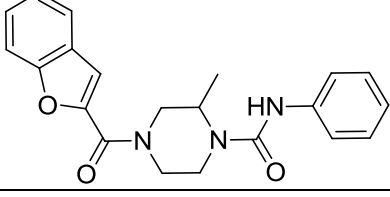
Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
36	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-metil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
37	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2-fluorfenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
38	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2-bromofenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
39	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2,4-difluorfenil)aminocarbonil]-2-metilpiperazina	
40	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-metil-1-[(2-metoxifenil)aminocarbonil]piperazina	
41	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-(fenilaminocarbonil)-2-metilpiperazina	

Tabla 13. Segunda generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina (compuestos **27-41**).

1.3. Derivados de 4-*tert*-Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil] piperazina: tercera generación (46-65)

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
46	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil] piperazina	
47	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil] piperazina	
48	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-trifluormetilfenil)aminocarbonil] piperazina	
49	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-fluorofenil)aminocarbonil] piperazina	
50	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(4-cianofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
51	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil] piperazina	
52	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(2-cloro-5-trifluormetilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
53	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-1-[(4-cloro-3-trifluormetilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
54	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]-piperazina	
55	4- <i>tert</i> -Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-metilfenil)aminocarbonil]-piperazina	
56	2-Fenil-1-[(4-Nitrofenil)aminocarbonil]-4-pivaloilpiperazina	

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
57	1-[(4-Cianofenil)aminocarbonil]-2-fenil-4-pivaloilpiperazina	
58	2-Fenil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]-4-pivaloilpiperazina	
59	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	
60	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
61	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(4-trifluormetilfenil)aminocarbonil]piperazina	
62	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(4-fluorofenil)aminocarbonil]-piperazina	
63	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-cianofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
64	4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]-piperazina	
65	4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	

Tabla 14. Tercera generación derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos **46-65**).

1.4. Derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina: potenciales inhibidores específicos de la AVP (68-72)

Nº	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
68	(E)-1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]-4-cinamil-2-fenilpiperazina	
69	(E)-4-(Cinamil)-1-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina	
70	4-(2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil)-N-(4-acetilfenil)-2-fenilpiperazina-1-carboxamida	
71	4-(2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil)-N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-2-fenilpiperazina-1-carboxamida	
72	(E)-4-cinamil-3-fenil-1-(piperidin-1-ilsulfonil)piperazina	

Tabla 15. Inhibidores potenciales específicos de la AVP derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos **68-72**).

2. Materiales y métodos

2.1. Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores específicos de la AVP: inmunofluorescencia indirecta

2.1.1. Librerías de compuestos

Para estudiar un posible efecto inhibitor sobre la actividad de la AVP se analizaron un total de 21 compuestos pertenecientes a diferentes librerías químicas que se indican a continuación.

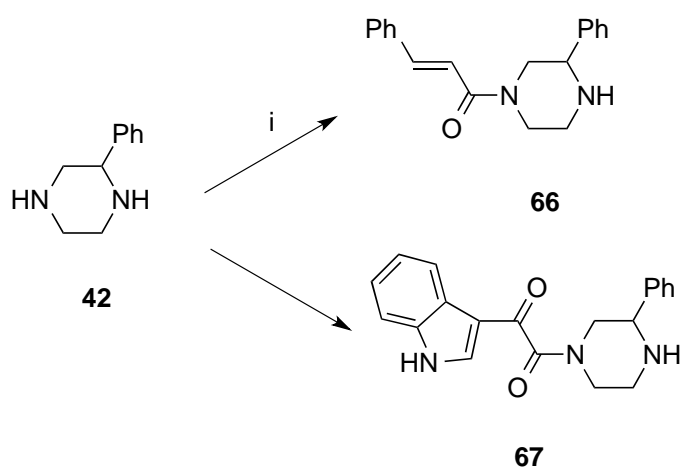
- a) Compuesto **2**: perteneciente a una librería de derivados de piperazin-2-ona, y prototipo empleado para el diseño de los derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina y 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina obtenidos durante las tres generaciones de optimización.
- b) Compuestos **13, 32, 34-36, 46, 49, 54, 57-60, 63-65**: derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-metilpiperazina y 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina, seleccionados para este ensayo por presentar valores de inhibición de HAdV en ensayo en placa superiores al 65% y que no manifestaron citotoxicidad asociada.
- c) Compuestos **68-72**: derivados de 2-fenilpiperazina sintetizados (a partir de los precursores **66** y **67**) para interaccionar con el sitio activo de la AVP e inhibir su actividad. Se detalla a continuación el procedimiento de síntesis de estos compuestos.

2.1.1.1. Procedimiento general 4. Reacción de N-acilación quimioselectiva de las 2-fenilpiperazinas (**66, 67**).

A una disolución de 2-fenilpiperazina (6,0 mmol) en diclorometano seco (80 ml) enfriada a 0 °C en una baño de agua-hielo se añade gota a gota durante 30 minutos una disolución del cloruro de acilo correspondiente (6,0

mmol en 20 mL de diclorometano) y, a continuación piridina (9 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 12 horas a esa temperatura y se deja posteriormente evolucionar a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica que todo el producto de partida ha reaccionado. La mezcla de reacción se evapora a sequedad para obtener el monoacilderivado correspondiente. La cromatografía en columna permitió la obtención de los compuestos puros con altos rendimientos (Figura 14).

Precursores



i: **42** 1 eq, haluro de acilo 1 eq, piridina 1.5 eq, diclorometano

Figura 14. Síntesis de los derivados de monoacilados de 2-fenilpiperazina **66** y **67** (precursores de los compuestos **68-72**).

1-Cinamoil-3-fenilpiperazina (**66**)

El producto se obtuvo como un sirupo y se purificó por cromatografía en columna usando hexano-acetato de etilo (1:7) como eluyente. (0,9 g, 55% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,75-7,30 (m, 12H), 4,52-4,43 (m, 1H), 4,35-4,23 (m, 1H), 3,76-3,63 (m, 2H), 3,56-3,25 (m, 2H), 3,12-2,66 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 141,6, 135,2, 129,5, 128,7, 128,3, 128, 2, 128,1 127,5, 127,3, 126,9, 118,3, 60,2, 59,4, 52,1, 48,9, 46,2,

45,5, 45,3, 41,8. HRMS (m/z): calcd. para $C_{19}H_{20}N_2ONa$ 315,1473 $[M+Na]^+$; encontrado 315,1456.

1-(3-indolglioxilil)-3-fenilpiperazina (67)

El producto se obtuvo como un sirupo y se purificó por cromatografía en columna usando diclorometano-metanol (60:1) como eluyente. (1,3 g, 64% rendimiento). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 12,36 (s, 1H), 8,21 (sa, 1H), 8,17-8,09 (m, 1H), 7,59-7,20 (m, 7H), 4,42-4,34 (m, 1H), 3,85-3,61 (m, 1H), 3,55–3,42 (m, 1H), 3,24-2,66 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 186,3, 186,2, 165,8, 141,7, 141,1, 137,1, 137,0, 136,9, 128,4, 128,3, 127,5, 127,4, 126,9, 126,7, 124,0, 124,7, 123,6, 122,5, 120,9, 120,8, 113,6, 113,1, 112,6, 60,9, 59,1, 52,9, 47,6, 46,1, 45,8, 45,1, 41,0. HRMS (m/z): calcd. para $C_{20}H_{20}N_3O$ 344.1550 $[M+H]^+$; encontrado 344.1544.

2.1.1.2. Procedimiento general 5. Síntesis de los urea derivados (68-71)

A una disolución del monoacilderivado (**66-67**) (0,35 mmol) en diclorometano seco (10 mL) se le añade el correspondiente isocianato (0,42 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica que el producto de partida ha reaccionado. Se evapora a sequedad y el producto obtenido se purifica por cromatografía en columna.

N-(4-acetilfenil)-4-cinamoil-2-fenilpiperazina-1-carboxamida (68)

El producto se obtuvo como un sólido y se purificó por cromatografía en columna usando diclorometano-metanol (20:1) como eluyente. (154 mg, 97% rendimiento). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,12, 9,06 (2s, 1H), 7,92-7,17 (m, 16H), 5,67-5,55 (m, 1H), 5,00-4,72 (m, 1H), 4,29-3,86 (m, 3H), 3,50-3,37 (m, 1H), 3,34 (m, 3H), 3,24-3,15 (m, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 169,4, 154,5, 145,1, 141,9, 141,7, 139,9, 135,0, 130,5, 129,6, 129,2, 128,7, 128,5,

128,1, 127,0, 118,4, 117,8, 117,6, , 54,2, 53,6, 47,5, 44,6, 43,1, 41,8, 26,3.
HRMS (m/z): calcd. para $C_{28}H_{27}N_3O_3Na$ 476,1945 $[M+Na]^+$; encontrado 476,1935.

N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-4-cinamoil-2-fenilpiperazina-1-carboxamida (69)

El producto se obtuvo como un sólido y se purificó por cromatografía en columna usando hexano-acetato de etilo (2,5:1) como eluyente. (167 mg, 93% rendimiento). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,46, 8,34 (2s, 1H), 8,03 (sa, 1H), 7,74-7,67 (m, 3H), 7,56-7,23 (m, 8H), 7,20 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 5,57-5,44 (m, 1H), 4,83-4,59 (m, 1H), 4,25-3,95 (m, 3H), 3,62-3,46 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 169,4, 154,6, 141,8, 141,6, 138,9, 137,4, 135,0, 130,4, 129,6, 128,7, 128,6, 128,0, 127,3, 127,0, 126,5, 121,4, 55,2, 54,5, 47,5, 44,6, 43,2, 42,1, 36,2, 28,3, 24,1. HRMS (m/z): calcd. para $C_{27}H_{23}ClF_3N_3O_3Na$ 536,1326 $[M+Na]^+$; encontrado 536,1308.

4-(2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil)-N-(4-acetilfenil)-2-fenilpiperazina-1-carboxamida (70)

El producto se obtuvo como un sólido y se purificó por cromatografía en columna usando hexano-acetato de etilo (1:2) como eluyente. (140 mg, 81% rendimiento). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,24, 12,17 (2d, J = 2,13 Hz, 1H), 9,14, 9,05 (2s, 1H), 8,18-7,06 (m, 14H), 5,76 (sa, 1H), 5,08-5,02 (m, 1H), 4,30-4,01 (m, 3H), 3,61-3,35 (m, 2H); 3,32 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 196,3, 185,6, 185,4, 166,6, 166,1, 154,7, 154,5, 145,1, 138,7, 138,2, 136,8, 136,3, 130,6, 130,5, 129,2, 129,1, 128,1, 126,9, 126,6, 126,3, 124,9, 124,7, 123,6, 123,5, 122,6, 122,5, 120,9, 120,8, 118,4, 118,3, 113,1, 112,6, 112,5, 59,7, 53,7, 53,2, 47,8, 45,1, 42,4, 40,9, 38,1, 26,3. HRMS (m/z): calcd. para $C_{29}H_{26}N_4O_4Na$ 517,1846 $[M+Na]^+$; encontrado 517,1834

4-(2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil)-N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-2 fenilpiperazina-1-carboxamida (71)

El producto se obtuvo como un sólido y se purificó por cromatografía en columna usando hexano-acetato de etilo (1:1) como eluyente. (117 mg, 60% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,26, 12,17 (2d, $J = 2,13$ Hz, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,30-7,10 (m, 13H), 5,68 (sa, 1H), 5,07-4,96 (m, 1H), 4,24-3,81 (m, 2H), 3,73-3,40 (m, 2H); 3,11-3,01 (m, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 185,6, 185,3, 166,7, 166,2, 154,7, 154,5, 145,1, 138,5, 138,1, 137,5, 137,3, 136,8, 136,4, 130,5, 130,4, 128,7, 128,3, 127,4, 127,3, 126,7, 126,3, 124,9, 124,7, 123,6, 123,5, 122,6, 122,5, 120,9, 120,8, 113,0, 112,6, 112,5, 54,8, 53,7, 47,9, 44,9, 42,5, 41,2, 36,2, 28,2, 24,2. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ 577,1225 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrado 577,1206.

2.1.1.3. Procedimiento general 6. Síntesis del disulfonamida derivado 72

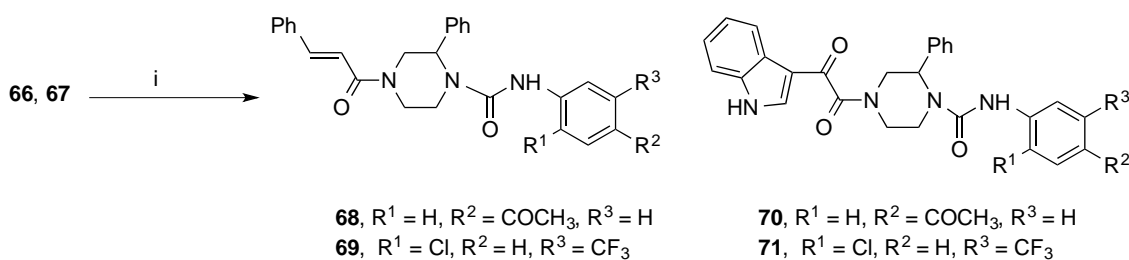
A una disolución del compuesto **66** (0,35 mmol) en diclorometano seco (10 ml) a 0 °C, se le añade el correspondiente reactivo (0,68 mmol) y piridina (0.7 mmol). La reacción se deja estar durante 24 horas (hasta que la cromatografía en capa fina indica que todo el producto de partida ha reaccionado). La mezcla de reacción se procesa evaporando a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna.

(E)-4-cinamil-3-fenil-1-(piperidin-1-ilsulfonil)piperazina (72)

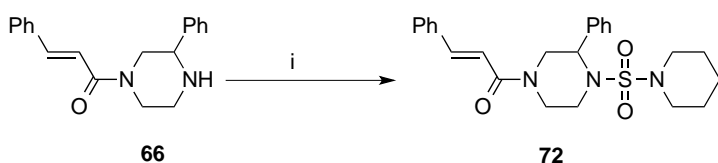
El producto se obtuvo como un sólido y se purificó por cromatografía en columna usando diclorometano-metanol (20:1) como eluyente. (100 mg, 65% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,75-7,04 (m, 12H), 5,00 (sa, 1H), 4,89-4,55 (m, 1H), 4,24-4,11 (m, 1H), 4,00-3,92 (m, 3H); 3,21-3,01 (m, 5H), 1,64-1,39 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,9, 141,9, 141,7, 138,6, 135,0, 130,5, 129,6, 128,7, 128,3, 128,0, 127,2, 126,9, 117,8, 57,3,

56,7, 48,2, 46,5, 44,4, 43,5, 41,7, 25,0, 23,1. HRMS (m/z): calcd. para $C_{24}H_{29}N_3O_3SNa$ 462,1822 $[M+Na]^+$; encontrado 462,1813.

Productos finales



i: monoamida 1 eq, isocianato o isotiocianato 1.2 eq, diclorometano



i: monoamida 1 eq, haluro de sulfonilo 1.5 eq, piridina 1.5, diclorometano

Figura 15. Síntesis de los nuevos derivados de 2-fenilpiperazina **68-72**.

2.1.2. Células y virus

La línea celular HeLa se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC). Las células se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies/Thermo Fisher), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Omega Scientific), 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 4 mM de L-glutamina (Lonza), 100 unidades/ml de penicilina (Lonza), 100 μ g/ml de estreptomicina (Lonza), y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich).

Para los ensayos de inmunofluorescencia se empleó la cepa fenotípicamente salvaje dl309 de HAdV5 obtenido del ATCC. El virus contiene

varias deleciones y una sustitución en la región E3B, pero presenta las características salvajes en las células en cultivo [182].

2.1.3. Anticuerpos

Se empleó un cóctel de tres anticuerpos primarios. El primero fue un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el péptido de citoqueratina 18 celular (clon KS-B17,2, Sigma-Aldrich) usado a una dilución 1:200. Los otros dos anticuerpos eran específicos de adenovirus, y eran el anticuerpo monoclonal 6A11 de rata dirigido contra la proteína de expresión temprana E4Orf3 [183] de HAdV5 procedente del sobrenadante de un cultivo de hybridoma y usado a una dilución 1:250, y un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra suero de HAdV5 [184] (teniendo como dianas las proteínas de la cápsida de HAdV5, incluyendo el hexón, las fibras y pentonas) usado a una dilución at 1:2000. La mezcla de anticuerpos secundarios empleados fueron anti-ratón, anti-rata y anti-conejo del tipo IgG conjugados a fluorocromos Alexa Fluor 488 (AF488), Alexa Fluor 546 (AF546) y Alexa Fluor 647 (AF647) de Invitrogen usados a 2 µg/ml.

2.1.4. Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Para este ensayo se sembraron 1×10^5 células HeLa en placas de 24 pocillos y se infectaron con la cepa dl309 (25 pv/célula). A las 5 horas tras el inicio de la infección se añadieron los distintos inhibidores a las células infectadas a una concentración de 50 µM o el mismo volumen de DMSO por triplicado. Pasadas 28 horas tras la infección se procedió a la fijación de las células infectadas e inmunomarcaje con los anticuerpos anti-citoqueratina 18, anti-E4orf3 y suero anti-HAdV5 como se detalla a continuación.

En primer lugar las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS), se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, y permeabilizaron durante 5 minutos con 0,2% de Triton X-100 en PBS a

temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con Buffer Tris-salino con albúmina de suero bovino (BSA), glicina, y Tween 20 (TBS-BGT: 0,137 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,025 M Tris-Cl [pH 8,0], 0,0015 M MgCl₂, 0,5% BSA, 0,1% glicina, 0,05% Tween 20, 0,02% azida sódica). Posteriormente las células se incubaron con el cóctel de los tres anticuerpos primarios diluidos en TBS-BGT suplementado con el 5% de suero normal de cabra (Invitrogen). Las muestras se incubaron con un volumen de 100 µl/pocillo y un tiempo de 90 min para los anticuerpos primarios, y de 30 minutos para los anticuerpos secundarios y con 3 lavados con TBS-BGT entre ambos. Finalmente, las muestras fueron montadas con 100 µl/pocillo de ProLong Gold mounting medium (Invitrogen) que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para el marcaje del núcleo celular.

2.1.5. Microscopía

Las microfotografías se obtuvieron mediante epifluorescencia estándar en un microscopio invertido Nikon TE300. Todas las microfotografías se capturaron con un objetivo de inmersión en aceite a una magnificación de 60x. Las imágenes se adquirieron en el equipo Nikon TE300 con una cámara digital Retiga de 12 bits (QImaging). Los núcleos fueron identificados y segmentados para delimitar los bordes celulares. La Figura 16 muestra un ejemplo del algoritmo empleado para la segmentación del núcleo y citoplasma para el ensayo de fluorescencia cuantitativa en células HeLa sanas e infectadas con dl309.

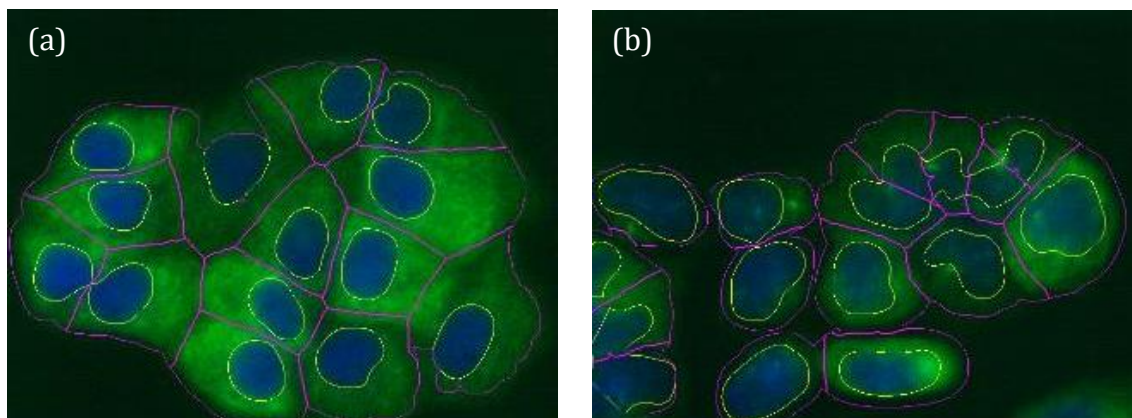


Figura 16. Ejemplo del algoritmo empleado para la segmentación del núcleo y citoplasma para el ensayo de fluorescencia cuantitativa en células HeLa sanas (a) e infectadas con dl309 (b). Los núcleos se definieron con la tinción DAPI (azul, bordes marcados en amarillo). Los bordes citoplasmáticos se definieron por la tinción de citoqueratina 18 en (a), y por la combinación de citoqueratina 18 y proteínas tardías del virus en (b) (verde, bordes marcados en magenta).

Las intensidades de fluorescencia media para cada fluoróforo y en cada muestra se guardaron y analizaron con el software EBIImage bajo el control del programa R (versión 3.2.2). Se mantuvieron unos valores fijos de exposición para evitar que ésta fuera insuficiente o una sobreexposición de las muestras. Se asignó un color (rojo, verde o azul) apropiado a cada fluoróforo. Todas las figuras se montaron con el editor open-source vector graphics Inkscape (version 0.48) y el editor raster graphics GIMP (version 2.8.4.).

Se fotografiaron entre 3 y 12 campos de células en cada pocillo. Cada campo fotográfico tenía entre 5 y 30 células con una mediana de 12 células. La expresión de los genes se midió como el Log_{10} de la fluorescencia total en cada célula. Para comparar la expresión de los genes respecto a las células tratadas con DMSO, los valores de la intensidad media de fluorescencia se calcularon como el Log_{10} para cada célula y tipo de tratamiento en un único campo fotográfico. Para comparar los niveles relativos de los niveles de expresión de los genes tempranos y tardíos, la intensidad de fluorescencia se analizó a nivel de células individuales.

2.1.6. Análisis estadístico

2.1.6.1. Expresión génica de genes tempranos y tardíos

Para determinar si los valores transformados en logarítmicos eran normales, se aplicó el test de Shapiro Wilk a la intensidad de la fluorescencia media para cada tipo de tratamiento. Después, para comparar la varianza entre grupos para los niveles de expresión de genes tempranos y tardíos, se empleó el test de Games-Howell. Para todas las comparaciones se empleó una prueba estadística bilateral donde valores de la p menores de 0,05 se consideraron significativos. Las diferencias significativas se muestran en las figuras con los siguientes símbolos: '****' $p < 0,001$, '***' $p < 0,01$, '**' $p < 0,05$ '.' $p < 0,1$.

2.1.6.2. Estudio de la intensidad relativa de citoqueratina 18 celular

Se empleó el test de la t de Student para determinar si la intensidad de citoqueratina 18 era menor en las células infectadas comparadas con las no infectadas en presencia de cada compuesto. A los valores de la p obtenidos se les aplicó el método de corrección de Bonferroni. Los valores de la $p > 0,05$ indicados con “*” muestran aquellos compuestos que previenen la reducción en la intensidad de citoqueratina 18 a consecuencia de la infección de HAdV.

2.1.6.3. Correlación entre la expresión de los genes tempranos y tardíos

La correlación entre la expresión de ambos genes se determinó mediante el método de Spearman a través de la función test de correlación del paquete psych del programa R. El valor de la p está asociado a los test cuya correlación es cero. Este valor se ajustó con el método de Holms para comparaciones múltiples. Los valores no se consideraron correlacionados cuando la $p > 0,05$.

2.2. Caracterización estructural de la AVP: Obtención de las estructura cristalinas de los complejos de AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN

2.2.1. Expresión y purificación de la AVP

2.2.1.1. Expresión de la AVP

El gen de la proteinasa de adenovirus, el gen para la proteína AVP de 23-KDa, se clonó en el vector de expresión pT7AD23k8 y se introdujo en la cepa de E. coli BL21 (DE3) bajo el control del sistema de expresión T7. Se empleó un stock de glicerol para dejar crecer durante toda la noche un cultivo en medio TB (1% Bacto-Triptona y 0,5% NaCl) suplementado con 50 mg/ml de ampicilina, y se empleó con una dilución 1:200 para sembrar 4 litros de medio M9-TBY (0,1% de NH_4Cl , 0,3% de KH_2PO_4 , 0,6% de Na_2HPO_2 , 0,4% de glucosa, 1 mM MgSO_4 , 0,1% de levadura, 1% Bacto-Triptona, y 0,5% de NaCl) suplementado con 50 mg/ml de ampicilina. Los cultivos crecieron en agitación a 30°C hasta que la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) se encontró entre 0,5 y 0,6. En ese momento, los cultivos fueron inducidos mediante la adición de 0,1 mM de IPTG, y se dejaron crecer durante 8-16 horas. Se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE que a las 8 horas, la mayor parte de las proteínas celulares correspondían a la AVP. Entonces, se recogieron las células mediante centrifugación a 5000g durante 10 minutos y se conservaron los pellets celulares a -20°C.

2.2.1.2. Purificación de la AVP

El siguiente paso consistió en la purificación de la AVP, y para ello debían lisarse las células que habían expresado el péptido, y a continuación emplear distintas columnas cromatográficas para obtener una purificación de la proteína de alto rendimiento y homogénea.

Partiendo de un pellet proveniente de 3 litros de bacterias celulares, éste se resuspendió en 150 ml (0,05 del volumen) de 50mM Tris (pH 8,0), 0.05%

(v/v) de Triton X-100, 15 mM de NaCl, y 5 mM de β -mercaptoetanol. Las células se lisaron mediante incubación durante 45 minutos a 4°C con lisozima blanca de huevo a una concentración de 100 mg/ml seguido de tres ciclos de congelación/ descongelación. Se digirió el ADN mediante la adición de 50 mg/ml de DNasa y 5 mM de $MgCl_2$, seguido de una incubación de 45 minutos a 4°C. La suspensión resultante se sometió a 3 ciclos de 30 segundos de sonicación. Esta fracción se denominó lisado.

El lisado se clarificó mediante centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos. Esta fracción llamada sobrenadante se cargó en una columna TSK-DEAE de 2,5 x 25 cm equilibrada en 50mM de Tris (pH 8,0), 15 mM de NaCl, y 5 mM de β -mercaptoetanol. Posteriormente se lavó la columna con 300 ml del buffer de equilibrio. Se identificaron mediante SDS-PAGE las fracciones que contenían AVP y se recolectaron y nombraron como DEAE FT.

La fracción de DEAE FT se sub-fraccionó en una columna de flujo rápido de S-Sefarosa equilibrada en 50 mM de Tris (pH 8,0), 15 mM de NaCl, y 1 mM de DTT. Después de cargar la columna, ésta se lavó con 200 ml de 50 mM de Tris (pH 8,0), 15 mM de NaCl, y 1 mM de DTT para retirar el Triton X-100. Entonces, se aplicó un gradiente lineal de 150 ml de 15–400 mM de NaCl en 50 mM de Tris (pH 8,0) a la columna. Las fracciones que contenían AVP se identificaron, mezclaron y nombraron como SSEPH. La AVP eluyó de esta columna a una fuerza iónica de 0,1M de NaCl.

La fracción de SSEPH se introdujo en una columna quelante de sefarosa cargada con zinc de 1,6 x 3,5 cm. La carga de zinc se llevó a cabo mediante un lavado de la resina con 0,05 M de EDTA y 1 M de NaCl, seguido de un lavado con agua para retirar el EDTA, y a continuación un lavado con 0,2 M de $ZnCl_2$ en 5 mM de HCl. Luego se equilibró la columna en 25 mM de HEPES (pH 8,0) y 0,1 M de NaCl. La columna se cargó con la fracción de SSEPH y se lavó con el buffer de equilibrio hasta que la OD280 nm fue \leq de 0,02. Entonces se aplicaron a la columna una serie de soluciones, cada una conteniendo 25 mM de HEPES (pH 8,0) y los siguientes constituyentes: 1 M de NaCl; 0,1 M de NaCl; 35 mM de imidazol y 0,1 M de NaCl; 0,1 M de NaCl; 35 mM de imidazol y

0,1 M NaCl; 0,1 M de NaCl; 35 mM de imidazol y 0,1 M de NaCl; y 0,1 M de NaCl. La AVP se eluyó en 25 mM de HEPES (pH 8,0), 0,1 M de NaCl, y 0,01 M de EDTA. Finalmente se realizó una diálisis con 20 mM de HEPES (pH 8,0), 5 mM de NaCl, y 0,1 mM de EDTA. Finalmente se obtuvieron 4 ml de enzima purificada (Figura 17) a una concentración de 4,9 mg/ml que se guardó a -20°C.

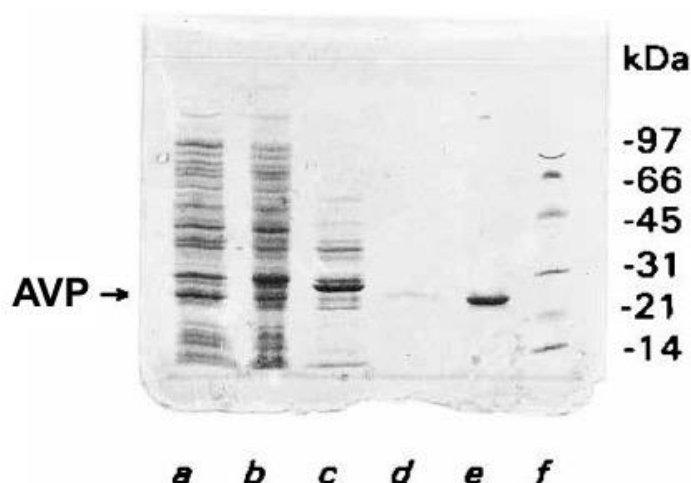


Figura 17. Purificación de la AVP de adenovirus. Se observan las muestras de los lisados de bacteria inducida con IPTG para expresar AVP (línea a), el sobrenadante del lisado centrifugado a 10000 x g (línea b), la fracción recogida de la etapa de la columna cromatográfica DEAE (línea c), la actividad de la fracción de la columna de S-Sepharosa (línea d), la AVP purificada a través de la columna de zinc-iminodiacético (línea e), y los marcadores moleculares (línea f) fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con Coomassie azul brillante. Adaptada de Mangel WF. y col., 1995.

2.3. Método de difusión por vapor: gota sentada

El método de vapor por difusión es una técnica en la que modificando las concentraciones de los agentes precipitantes y la concentración de proteína de manera simultánea puede conseguirse el estado de supersaturación [185]. Dentro de este método, uno de los más empleados es el de la gota sentada, donde una gota que contiene la proteína se asienta sobre una superficie determinada (Figura 18a).

En este caso se desarrolla un gradiente de concentración entre la gota que contiene a la proteína y el líquido presente en un reservorio inferior, de tal manera que la concentración del agente precipitante siempre es mayor en el reservorio que la gota. Lo que ocurre es que esta situación permite que se evapore el agua de la gota, disminuyendo su volumen e incrementando la concentración de la proteína y el precipitante. En algún punto, la concentración de la proteína debería alcanzar un estado de supersaturación y si el resto de parámetros, los cuales son importantes para la cristalización, tales como el pH, temperatura, aditivos etc., son óptimos, la proteína puede cristalizar. La cristalización de las proteínas comienza la fase de nucleación y cristalización rápida, por consiguiente la concentración de la proteína disminuye y entra en la fase de saturación donde ocurre el crecimiento y formación de las estructuras cristalinas completas en un ambiente metaestable (Figura 18b).

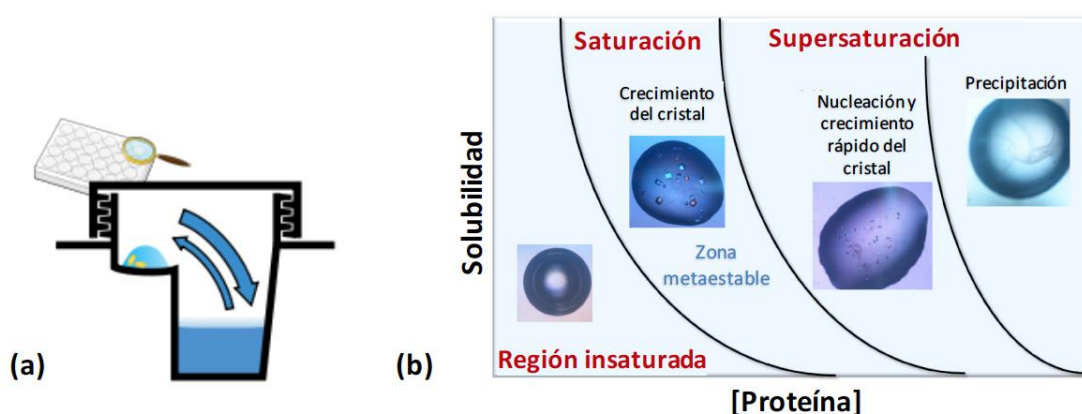


Figura 18. Método de la gota sentada (a) (Adaptado de www.wikipedia.es) y proceso de formación de cristales de proteínas (b) (Adaptado de Russo Krauss I. y col., 2013).

3. Composición química de los búffers fabricados empleados en los ensayos para la obtención de los complejos cristalinos AVP-pVlc y AVP-pVlc-ADN

3.1. Búffer HPLS1

Número	Pocillo	PEG	% PEG	Búffer (0.1M)	pH	Aditivo (0.1M)
1	A1	MMW	20	NaOAc	4,6	
2	A2	MMW	20	Citrato/Fosfato	5,5	
3	A3	MMW	20	MES	6,5	
4	A4	MMW	20	HEPES	7,5	
5	A5	MMW	20	Tris	8,5	
6	A6	MMW	20	Bicina	9,5	
7	A7	BMW	15	NaOAc	4,6	
8	A8	BMW	15	MES	6,5	
9	A9	BMW	15	HEPES	7,5	
10	A10	BMW	15	Tris	8,5	
11	A11	BMW	15	Bicina	9,5	
12	A12	BMW	15	Citrato/Fosfato	5,5	
13	B1	MMW	20	MES	6,5	MgCl ₂
14	B2	MMW	15	HEPES	7,5	MgCl ₂
15	B3	MMW	8	Tris	8,5	MgCl ₂
16	B4	MMW	12			MgCl ₂
17	B5	MMW	6	NaOAc	4,6	MgCl ₂
18	B6	MMW	18	MES	6,5	CaCl ₂
19	B7	BMW	20	MES	6,5	MgCl ₂
20	B8	BMW	15	HEPES	7,5	MgCl ₂
21	B9	BMW	8	Tris	8,5	MgCl ₂
22	B10	BMW	12			MgCl ₂
23	B11	BMW	6	NaOAc	4,6	MgCl ₂
24	B12	BMW	18	MES	6,5	CaCl ₂
25	C1	MMW	20	HEPES	7,5	CaCl ₂
26	C2	MMW	15	Tris	8,5	CaCl ₂
27	C3	MMW	8	Bicina	9,5	CaCl ₂
28	C4	MMW	12	NaOAc	4,6	CaCl ₂
29	C5	MMW	6	MES	6,5	NaCl
30	C6	MMW	18	HEPES	7,5	NaCl
31	C7	BMW	20	HEPES	7,5	CaCl ₂
32	C8	BMW	15	Tris	8,5	CaCl ₂
33	C9	BMW	8	Bicina	9,5	CaCl ₂
34	C10	BMW	12	NaOAc	4,6	CaCl ₂
35	C11	BMW	6	MES	6,5	NaCl
36	C12	BMW	18	HEPES	7,5	NaCl
37	D1	MMW	20			NaCl
38	D2	MMW	15	Bicina	9,5	NaCl
39	D3	MMW	8	NaOAc	4,6	NaCl
40	D4	MMW	12	MES	6,5	NH ₄ OAc
41	D5	MMW	6	HEPES	7,5	NH ₄ OAc
42	D6	MMW	18	Tris	8,5	LiOAc

VIII. ANEXO

Número	Pocillo	PEG	% PEG	Búffer (0.1M)	pH	Aditivo (0.1M)
43	D7	BMW	20			NaCl
44	D8	BMW	15	Bicina	9,5	NaCl
45	D9	BMW	8	NaOAc	4,6	NaCl
46	D10	BMW	12	MES	6,5	NH ₄ OAc
47	D11	BMW	6			NH ₄ OAc
48	D12	BMW	18	Tris	8,5	LiOAc
49	E1	MMW	20	Bicina	9,5	LiOAc
50	E2	MMW	15			LiOAc
51	E3	MMW	8	MES	6,5	NH ₄ OAc
52	E4	MMW	12	HEPES	7,5	Na Citrato
53	E5	MMW	6	Tris	8,5	Na Citrato
54	E6	MMW	18	Bicina	9,5	K Citrato
55	E7	BMW	20	Bicina	9,5	LiOAc
56	E8	BMW	15			LiOAc
57	E9	BMW	8	MES	6,5	NH ₄ OAc
58	E10	BMW	12	HEPES	7,5	Na Citrato
59	E11	BMW	6	Tris	8,5	Na Citrato
60	E12	BMW	18	Bicina	9,5	K Citrato
61	F1	MMW	20	NaOAc	4,6	K Citrato
62	F2	MMW	15	MES	6,5	K Citrato
63	F3	MMW	8	HEPES	7,5	(NH ₄) ₂ SO ₄
64	F4	MMW	12	Tris	8,5	(NH ₄) ₂ SO ₄
65	F5	MMW	6			(NH ₄) ₂ SO ₄
66	F6	MMW	18	NaOAc	4,6	MgSO ₄
67	F7	BMW	20	NaOAc	4,6	K Citrato
68	F8	BMW	15	MES	6,5	K Citrato
69	F9	BMW	8	HEPES	7,5	(NH ₄) ₂ SO ₄
70	F10	BMW	12			(NH ₄) ₂ SO ₄
71	F11	BMW	6	Bicina	9,5	(NH ₄) ₂ SO ₄
72	F12	BMW	18	NaOAc	4,6	MgSO ₄
73	G1	MMW	20	MES	6,5	MgSO ₄
74	G2	MMW	15	HEPES	7,5	LiSO ₄
75	G3	MMW	8	Tris	8,5	LiSO ₄
76	G4	MMW	12	Bicina	9,5	LiSO ₄
77	G5	MMW	6			Mg Formiato
78	G6	MMW	18	MES	6,5	Mg Formiato
79	G7	BMW	20	MES	6,5	MgSO ₄
80	G8	BMW	15	HEPES	7,5	LiSO ₄
81	G9	BMW	8	Tris	8,5	LiSO ₄
82	G10	BMW	12	Bicina	9,5	LiSO ₄
83	G11	BMW	6	NaOAc	4,6	Mg Formiato
84	G12	BMW	18	MES	6,5	Mg Formiato
85	H1	MMW	20	HEPES	7,5	Mg Formiato
86	H2	MMW	15	Tris	8,5	Na Formiato
87	H3	MMW	8	Bicina	9,5	Na Formiato
88	H4	MMW	12	NaOAc	4,6	Na Formiato
89	H5	MMW	6	MES	6,5	NH ₄ Formiato
90	H6	MMW	18	HEPES	7,5	NH ₄ Formiato
91	H7	BMW	20	HEPES	7,5	Mg Formiato
92	H8	BMW	15			Na Formiato

Número	Pocillo	PEG	% PEG	Búffer (0.1M)	pH	Aditivo (0.1M)
93	H9	BMW	8	Bicina	9,5	Na Formiato
94	H10	BMW	12	NaOAc	4,6	Na Formiato
95	H11	BMW	6	MES	6,5	NH ₄ Formiato
96	H12	BMW	18	HEPES	7,5	NH ₄ Formiato

Tabla 16. Composición química y distribución del búffer HPLS1 en una placa de 96 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilenglicol.

3.2. Búffer HPLS2

Número	Pocillo	PEG	Búffer (0.1M)	pH	% PEG	Aditivo (0.1M)
1	A1	MMW	NaOAc	4,6	20	KOAc
2	A2	MMW	Citrate/Phosphate	5,5	20	NH ₄ OAc
3	A3	MMW	MES	6,5	20	CaOAc
4	A4	MMW	HEPES	7,5	20	NaOAc
5	A5	MMW	Tris	8,5	20	ZnOAc
6	A6	MMW	Bicine	9,5	20	MgOAc
7	A7	MMW	NaOAc	4,6	20	LiOAc
8	A8	MMW	MES	6,5	20	LiCl
9	A9	MMW	HEPES	7,5	20	MgCl ₂
10	A10	MMW	Tris	8,5	20	NaCl
11	A11	MMW	Bicine	9,5	20	CaCl ₂
12	A12	MMW	Citrate/Phosphate	5,5	20	KCl
13	B1	MMW	MES	6,5	20	NH ₄ Cl
14	B2	MMW	HEPES	7,5	20	MnCl ₂
15	B3	MMW	Tris	8,5	20	NH ₄ citrate
16	B4	MMW			20	Na Citrate
17	B5	MMW	NaOAc	4,6	20	K citrate
18	B6	MMW	MES	6,5	20	NaF
19	B7	MMW	MES	6,5	20	KF
20	B8	MMW	HEPES	7,5	20	NH ₄ F
21	B9	MMW	Tris	8,5	20	K formate
22	B10	MMW			20	Na formate
23	B11	MMW	NaOAc	4,6	20	NH ₄ formate
24	B12	MMW	MES	6,5	20	Mg Formate
25	C1	MMW	HEPES	7,5	20	NaI
26	C2	MMW	Tris	8,5	20	KI
27	C3	MMW	Bicine	9,5	20	NH ₄ I
28	C4	MMW	NaOAc	4,6	20	Mg(NO ₃) ₂
29	C5	MMW	MES	6,5	20	NaNO ₃
30	C6	MMW	HEPES	7,5	20	KNO ₃
31	C7	MMW	HEPES	7,5	20	NH ₄ NO ₃
32	C8	MMW	Tris	8,5	20	KH ₂ PO ₄ (monobasic)

VIII. ANEXO

Número	Pocillo	PEG	% PEG	Búffer (0.1M)	pH	Aditivo (0.1M)
33	C9	MMW	Bicine	9,5	20	K ₂ HPO ₄ (dibasic)
34	C10	MMW	NaOAc	4,6	20	NH ₄ H ₂ PO ₄ (monobasic)
35	C11	MMW	MES	6,5	20	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (dibasic)
36	C12	MMW	HEPES	7,5	20	NaH ₂ PO ₄ (monobasic)
37	D1	MMW			20	Na ₂ HPO ₄ (dibasic)
38	D2	MMW	Bicine	9,5	20	K ₂ SO ₄
39	D3	MMW	NaOAc	4,6	20	Na ₂ SO ₄
40	D4	MMW	MES	6,5	20	MgSO ₄
41	D5	MMW	HEPES	7,5	20	LiSO ₄
42	D6	MMW	Tris	8,5	20	Na thiocynate
43	D7	MMW			20	K thiocynate
44	D8	MMW	Bicine	9,5	20	Na tartrate
45	D9	MMW	NaOAc	4,6	20	NH ₄ tartrate
46	D10	MMW	MES	6,5	20	K tartrate
47	D11	MMW			20	RbCl
48	D12	MMW	Tris	8,5	20	NaBr
49	E1	BMW	Bicine	9,5	20	KOAc
50	E2	BMW			20	NH ₄ OAc
51	E3	BMW	MES	6,5	20	CaOAc
52	E4	BMW	HEPES	7,5	20	NaOAc
53	E5	BMW	Tris	8,5	20	ZnOAc
54	E6	BMW	Bicine	9,5	20	MgOAc
55	E7	BMW	Bicine	9,5	20	LiOAc
56	E8	BMW			20	LiCl
57	E9	BMW	MES	6,5	20	MgCl ₂
58	E10	BMW	HEPES	7,5	20	NaCl
59	E11	BMW	Tris	8,5	20	CaCl ₂
60	E12	BMW	Bicine	9,5	20	KCl
61	F1	BMW	NaOAc	4,6	20	NH ₄ Cl
62	F2	BMW	MES	6,5	20	MnCl ₂
63	F3	BMW	HEPES	7,5	20	NH ₄ citrate
64	F4	BMW	Tris	8,5	20	Na Citrate
65	F5	BMW			20	K citrate
66	F6	BMW	NaOAc	4,6	20	NaF
67	F7	BMW	NaOAc	4,6	20	KF
68	F8	BMW	MES	6,5	20	NH ₄ F
69	F9	BMW	HEPES	7,5	20	K formate
70	F10	BMW			20	Na formate
71	F11	BMW	Bicine	9,5	20	NH ₄ formate
72	F12	BMW	NaOAc	4,6	20	Mg Formate
73	G1	BMW	MES	6,5	20	NaI
74	G2	BMW	HEPES	7,5	20	KI
75	G3	BMW	Tris	8,5	20	NH ₄ I
76	G4	BMW	Bicine	9,5	20	Mg(NO ₃) ₂
77	G5	BMW			20	NaNO ₃
78	G6	BMW	MES	6,5	20	KNO ₃
79	G7	BMW	MES	6,5	20	NH ₄ NO ₃

Número	Pocillo	PEG	% PEG	Búffer (0.1M)	pH	Aditivo (0.1M)
80	G8	BMW	HEPES	7,5	20	KH ₂ PO ₄
81	G9	BMW	Tris	8,5	20	K ₂ HPO ₄ (dibasic)
82	G10	BMW	Bicine	9,5	20	NH ₄ H ₂ PO ₄ (monobasic)
83	G11	BMW	NaOAc	4,6	20	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (dibasic)
84	G12	BMW	MES	6,5	20	NaH ₂ PO ₄ (monobasic)
85	H1	BMW	HEPES	7,5	20	Na ₂ HPO ₄ (dibasic)
86	H2	BMW	Tris	8,5	20	K ₂ SO ₄
87	H3	BMW	Bicine	9,5	20	Na ₂ SO ₄
88	H4	BMW	NaOAc	4,6	20	MgSO ₄
89	H5	BMW	MES	6,5	20	LiSO ₄
90	H6	BMW	HEPES	7,5	20	Na thiocynate
91	H7	BMW	HEPES	7,5	20	K thiocynate
92	H8	BMW			20	Na tartrate
93	H9	BMW	Bicine	9,5	20	NH ₄ tartrate
94	H10	BMW	NaOAc	4,6	20	K tartrate
95	H11	BMW	MES	6,5	20	RbCl
96	H12	BMW	HEPES	7,5	20	NaBr

Tabla 17. Composición química y distribución del búffer HPLS2 en una placa de 96 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilenglicol.

3.3. Búffer PEG INFAC

Número	Pocillo	PEG	% PEG	pH	Aditivo
1	A1	BMW	6	4,6	
2	A2	BMW	16	6	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
3	A3	MMW	11	7,5	0,05M MgCl ₂
4	A4	BMW	20	7,5	0,1M CaCl ₂
5	A5	MMW	6	4,6	0,05M CaCl ₂
6	A6	MMW	16	7,5	0,1M NaCl, 0,05M MgCl ₂
7	A7	BMW	11	6	0,1M NaCl
8	A8	BMW	20	6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
9	A9	BMW	16	4,6	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
10	A10	BMW	25	7,5	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
11	A11	MMW	20	6	0,1M MgCl ₂
12	A12	BMW	11	4,6	
13	B1	MMW	25	6	0,1M MgCl ₂ , 0,1M NaCl
14	B2	BMW	20	7,5	0,1M NaCl
15	B3	BMW	11	4,6	0,1M CaCl ₂

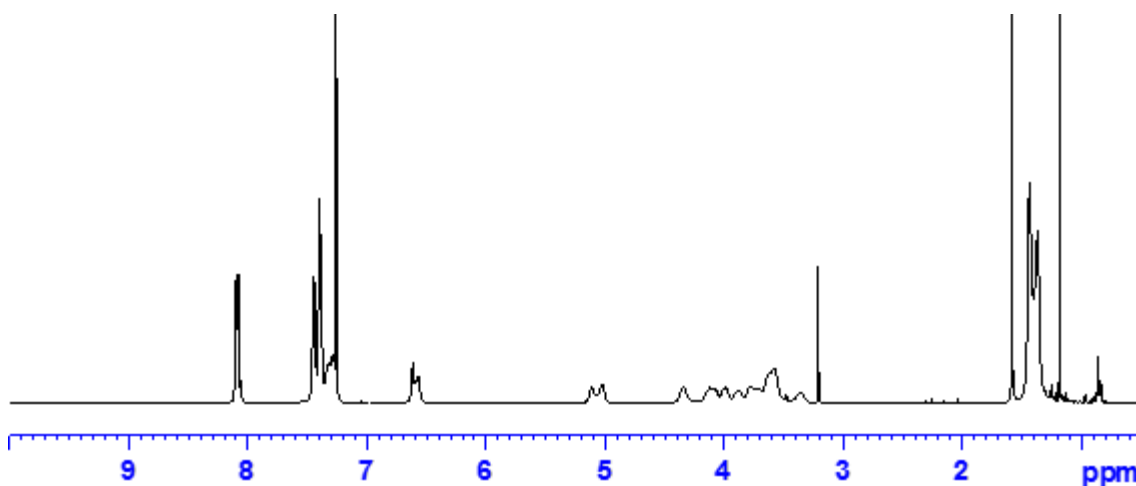
Número	Pocillo	PEG	% PEG	pH	Aditivo
16	B4	BMW	6	6	
17	B5	BMW	11	4,6	0,05M MgCl ₂ , 0,1M NaCl
18	B6	MMW	20	4,6	0,1M NaCl
19	B7	MMW	16	6	0,05M MgCl ₂
20	B8	BMW	6	6	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
21	B9	BMW	20	4,6	0,1M MgCl ₂ , 0,1M NaCl
22	B10	MMW	11	7,5	0,1M CaCl ₂
23	B11	BMW	16	7,5	
24	B12	MMW	6	4,6	0,1M NaCl
25	C1	BMW	16	4,6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
26	C2	MMW	20	6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
27	C3	BMW	6	6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
28	C4	BMW	11	7,5	0,1M CaCl ₂
29	C5	BMW	20	7,5	0,05M CaCl ₂
30	C6	MMW	16	7,5	0,1M CaCl ₂
31	C7	BMW	11	6	
32	C8	BMW	6	7,5	
33	C9	BMW	16	6	0,1M NaCl, 0,1M MgCl ₂
34	C10	BMW	20	4,6	0,1M NaCl, 0,05M NaCl
35	C11	MMW	11	4,6	0,1M NaCl
36	C12	MMW	6	6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
37	D1	MMW	6	7,5	0,05M CaCl ₂
38	D2	BMW	16	4,6	0,05M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
39	D3	BMW	20	6	0,1M CaCl ₂
40	D4	BMW	11	4,6	0,1M MgCl ₂ , 0,1M NaCl
41	D5	MMW	11	4,6	0,1M MgCl ₂ , 0,1M NaCl
42	D6	BMW	6	6	
43	D7	BMW	20	7,5	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
44	D8	MMW	16	7,5	0,1M NaCl, 0,05M MgCl ₂
45	D9	BMW	8	7,5	0,05M CaCl ₂
46	D10	BMW	6	4,6	0,05M MgCl ₂
47	D11	BMW	11	6	0,1M CaCl ₂ , 0,1M NaCl
48	D12	MMW	25	7,5	0,1M CaCl ₂

Tabla 18. Composición química y distribución del búffer PEG INFAC en una placa de 48 pocillos. MMW: peso molecular medio; BMW: peso molecular de rango amplio; MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PEG: polietilenglicol.

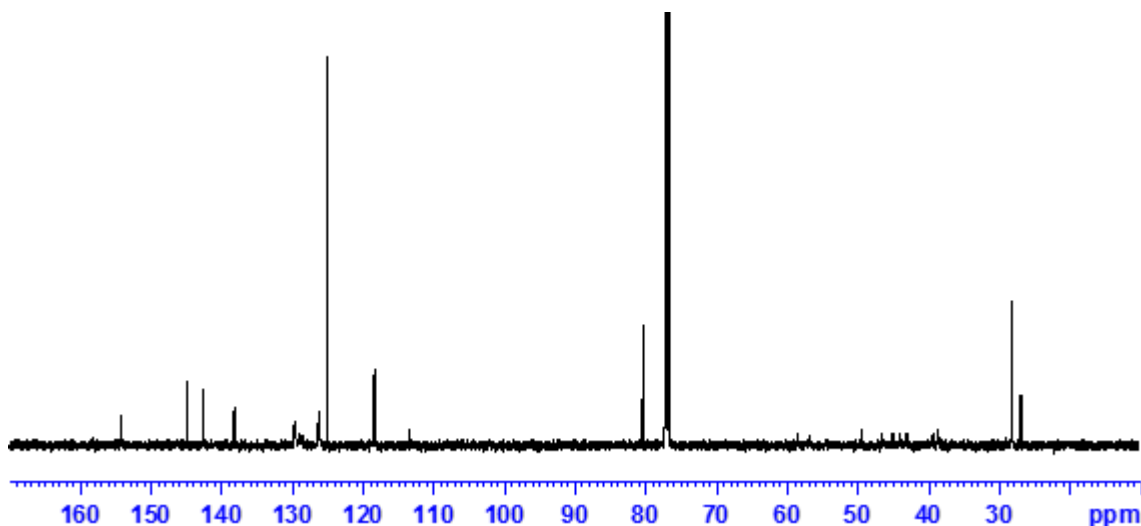
(Búffers: 0,1M NaAc pH 4,6; 0,1 M MES pH 6,0; 0,1 M HEPES pH 7,5)

4. Espectros de RMN

4.1. Compuestos seleccionados 46, 59, 60, 63, 64 y 65 derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina

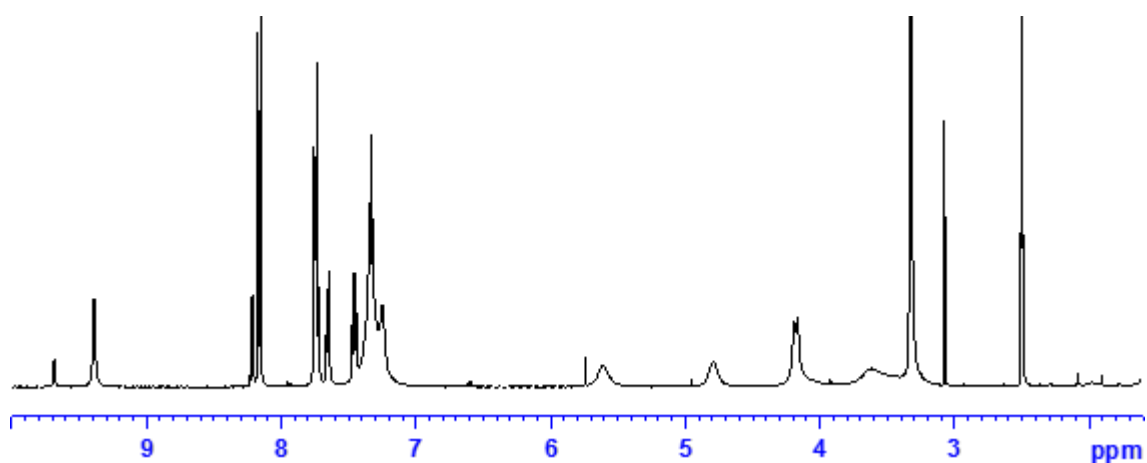


^1H -RMN de 4-*terc*-Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil] piperazina (**46**)

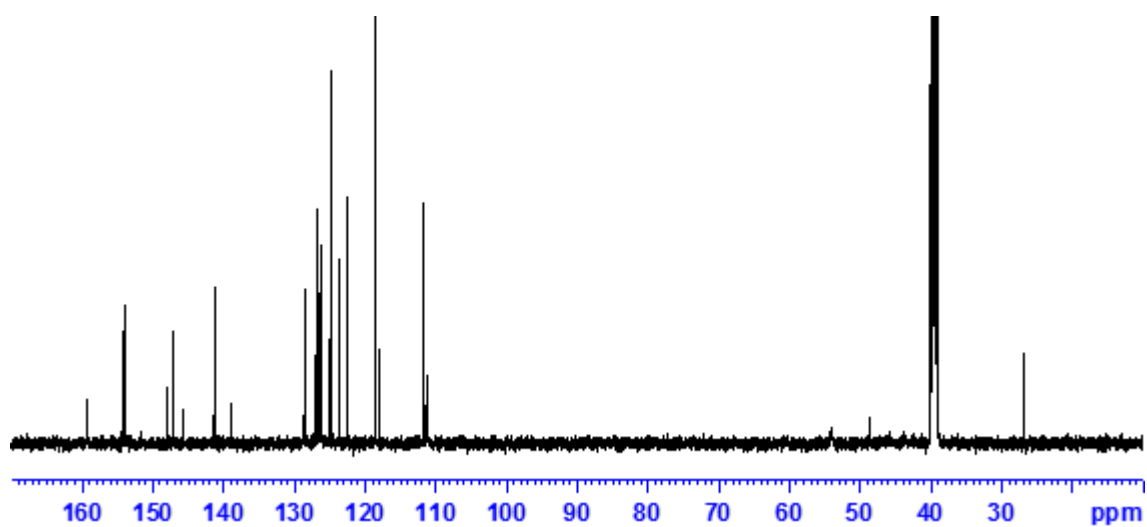


^{13}C -RMN de 4-*terc*-Butoxicarbonil-2-fenil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil] piperazina (**46**)

Figura 19. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **46**.

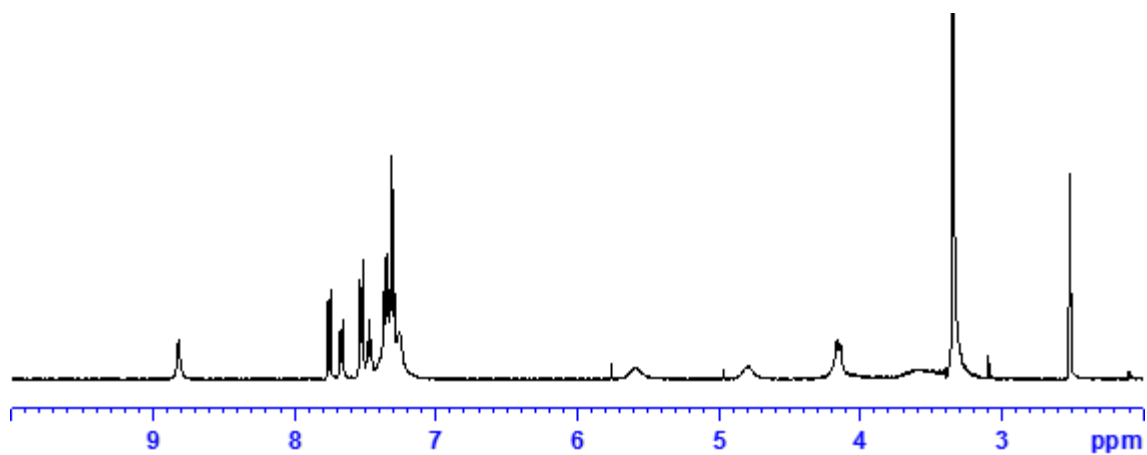


^1H -RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina (**59**)

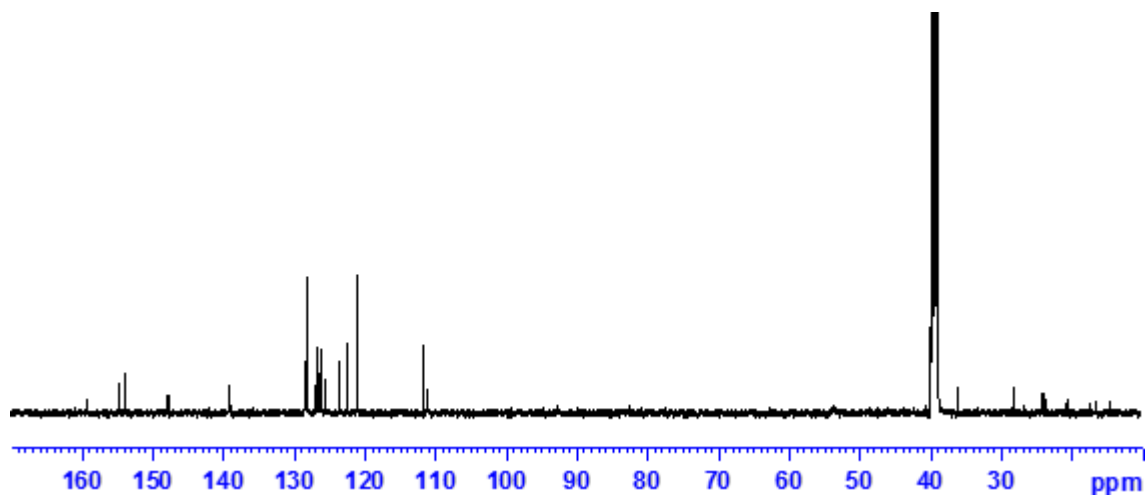


^{13}C -RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina (**59**)

Figura 20. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **59**.

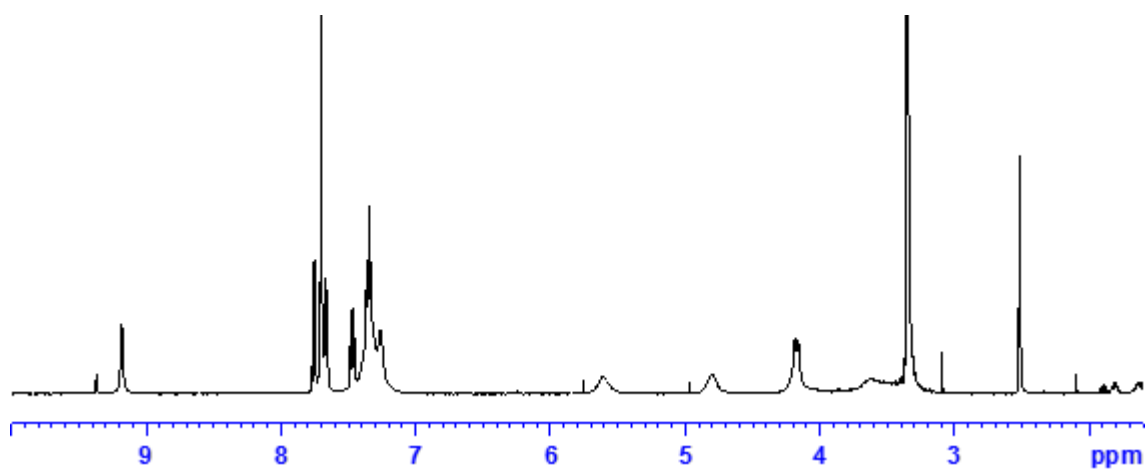


¹H-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**60**)

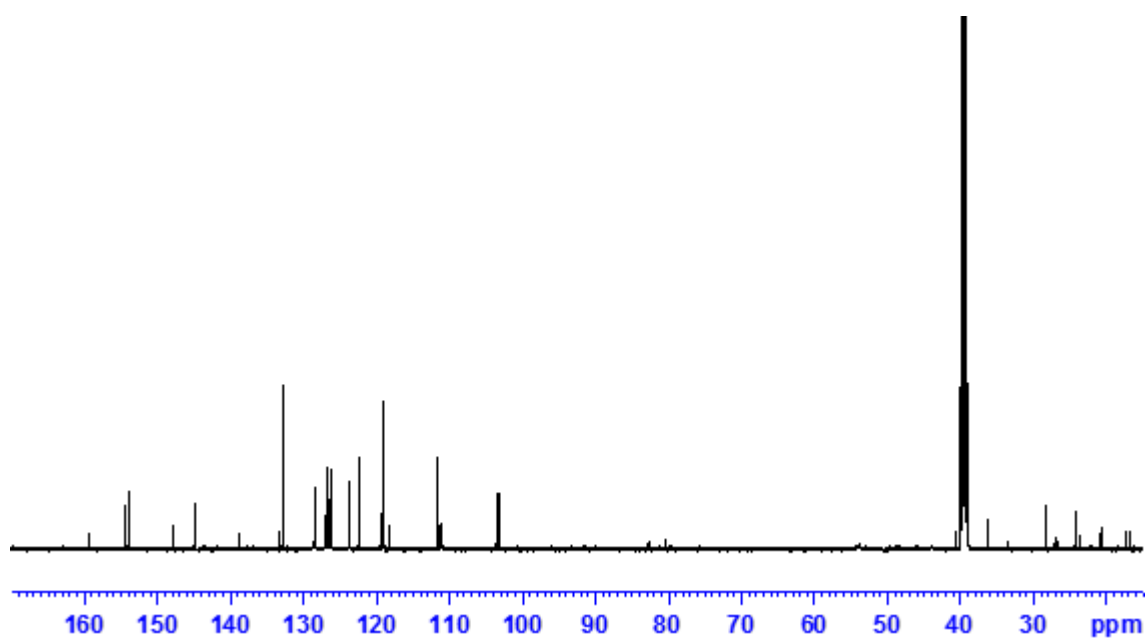


¹³C-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-clorofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**60**)

Figura 21. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **60**.

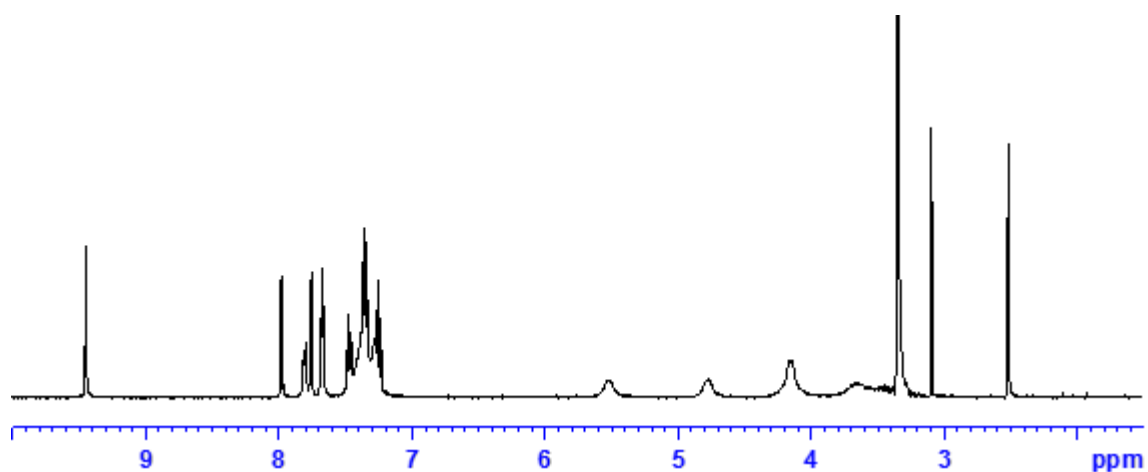


¹H-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-cianofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**63**)

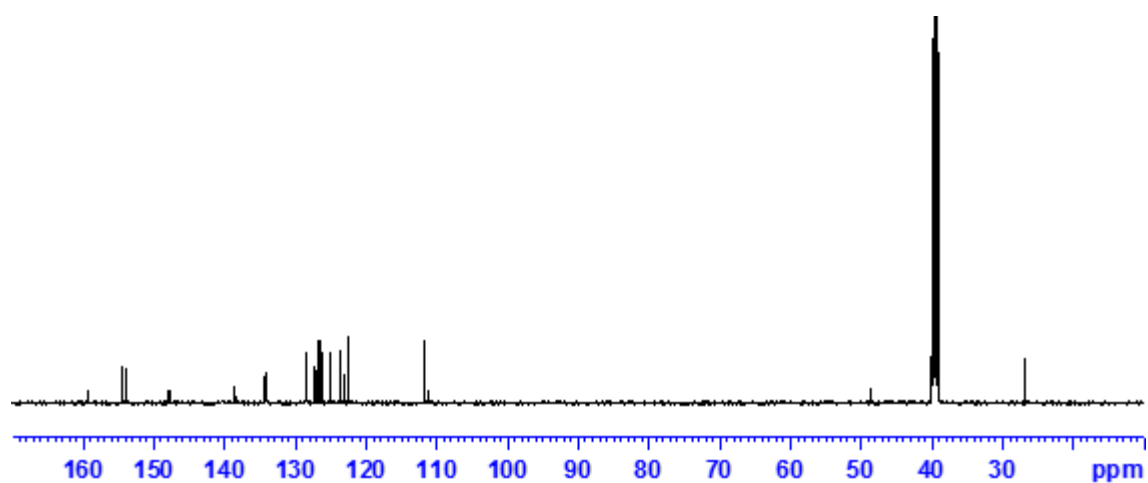


¹³C-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(4-cianofenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**63**)

Figura 22. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **63**.

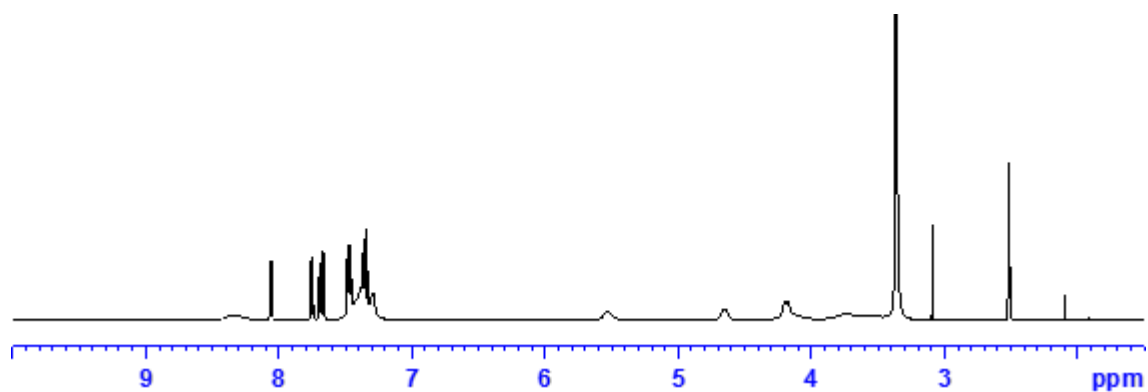


^1H -RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]-piperazina (**64**)

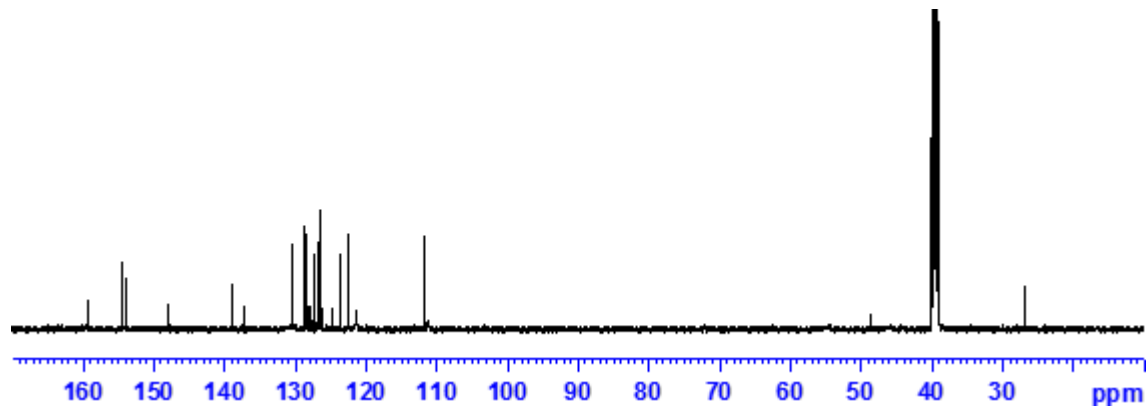


^{13}C -RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]-piperazina (**64**)

Figura 23. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **64**.



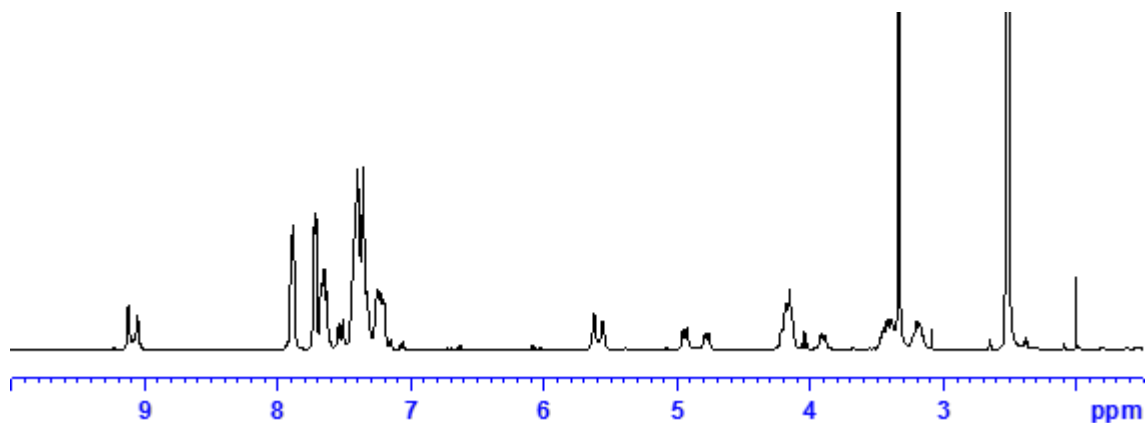
¹H-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**65**)



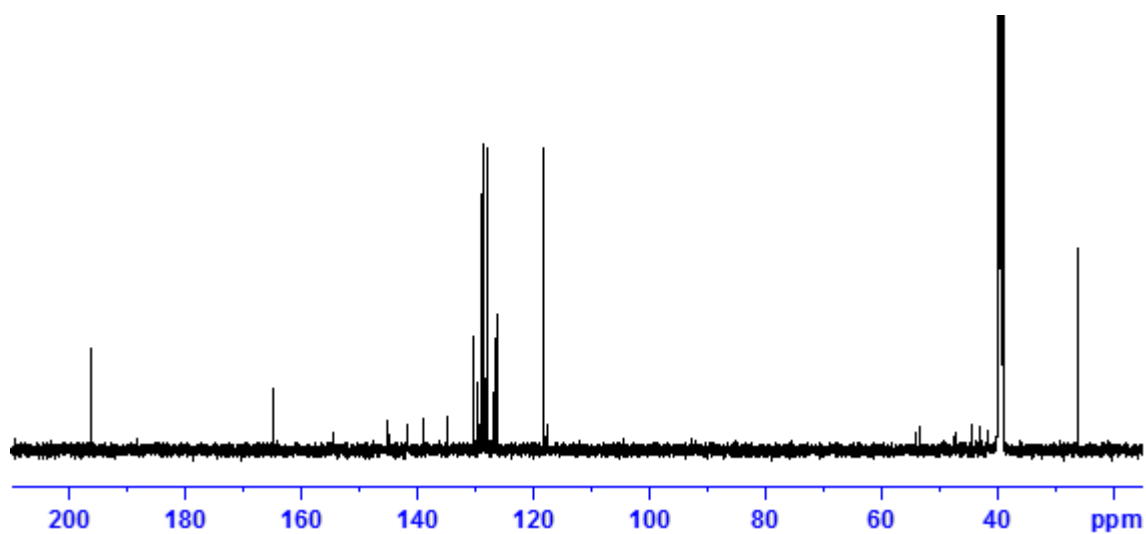
¹³C-RMN de 4-(Benzofurano-2-carbonil)-1-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**65**)

Figura 24. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **65**.

4.2. Inhibidores potenciales específicos de la AVP derivados de 4-acil-1-fenilaminocarbonil-2-fenilpiperazina (compuestos 68-72).

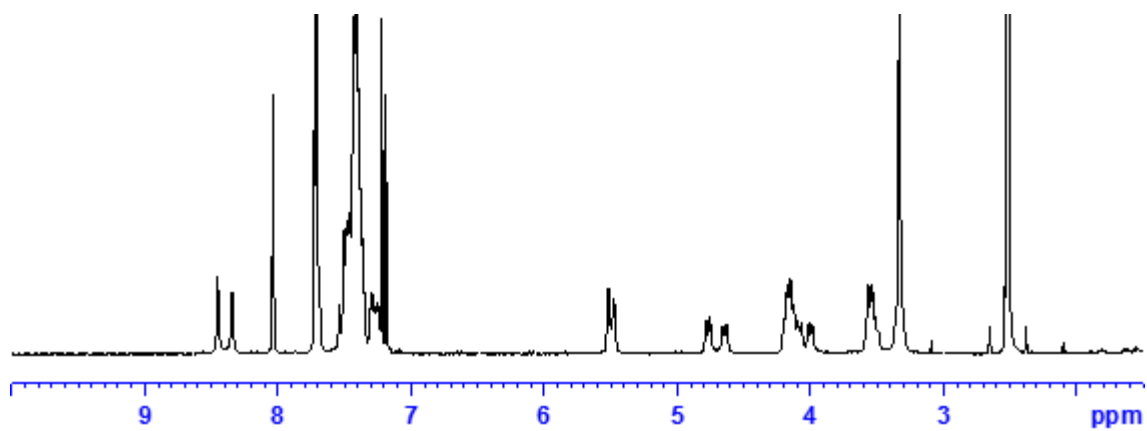


¹H RMN de (E)-1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]-4-cinamil-2-fenilpiperazina (**68**)

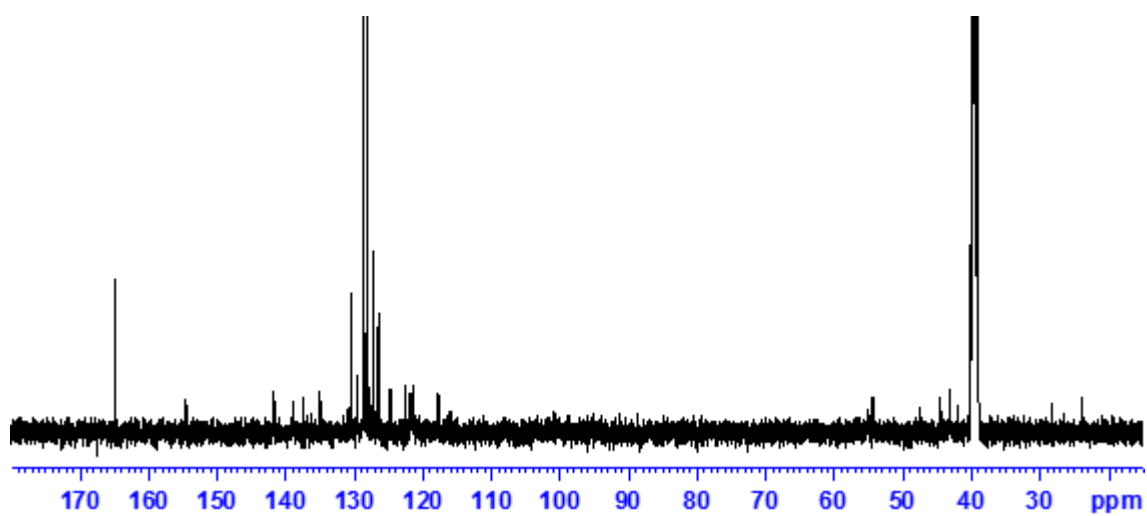


¹³C RMN de (E)-1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]-4-cinamil-2-fenilpiperazina (**68**)

Figura 25. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **68**.

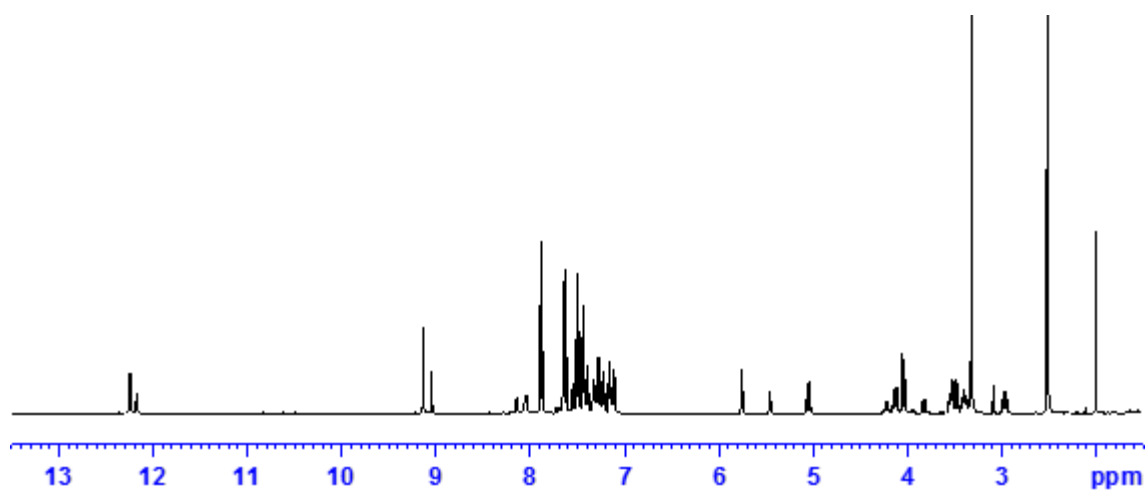


¹H RMN de (E)-4-(Cinamil)-1-[(2-cloro-5-trifluormetilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**69**)

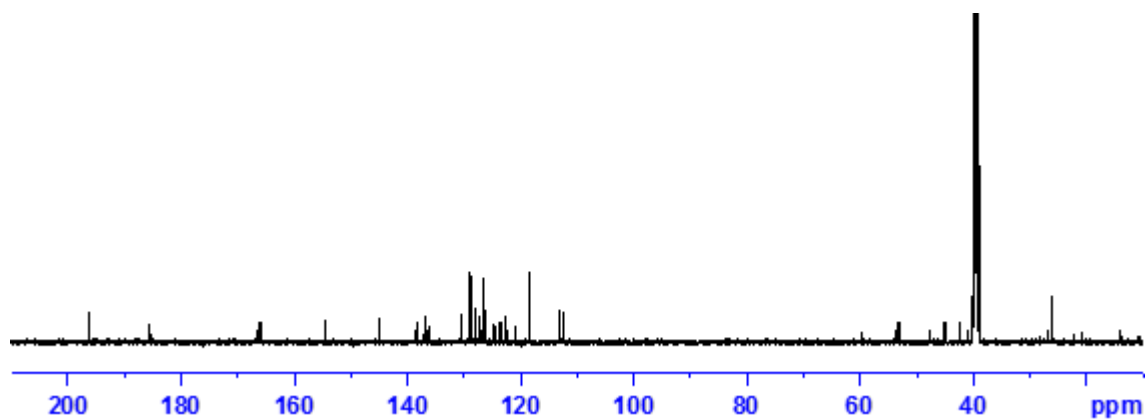


¹³C RMN de (E)-4-(Cinamil)-1-[(2-cloro-5-trifluormetilfenil)aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**69**)

Figura 26. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **69**.

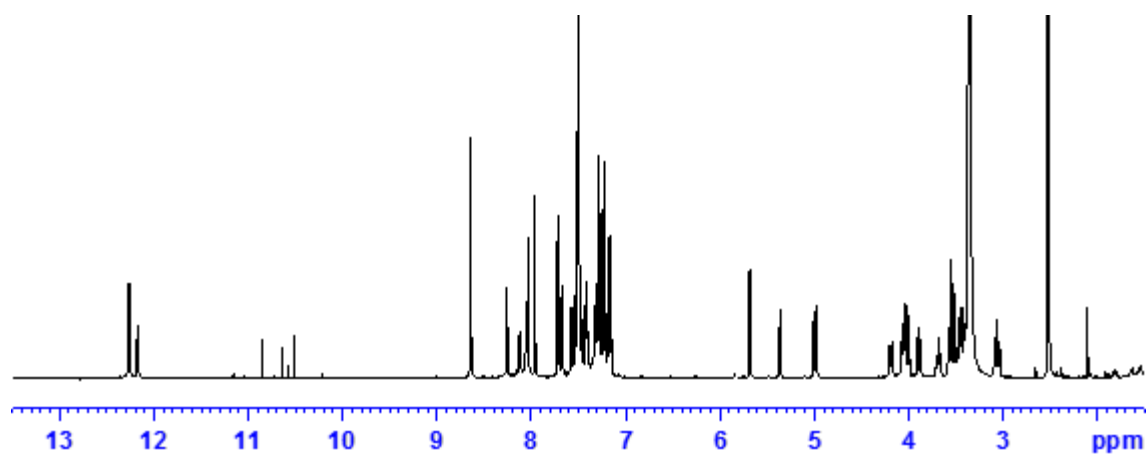


^1H RMN de 1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]-2-fenil-4-[2-(1H-indol-3-il)-oxoacetil]-piperazina (**70**)

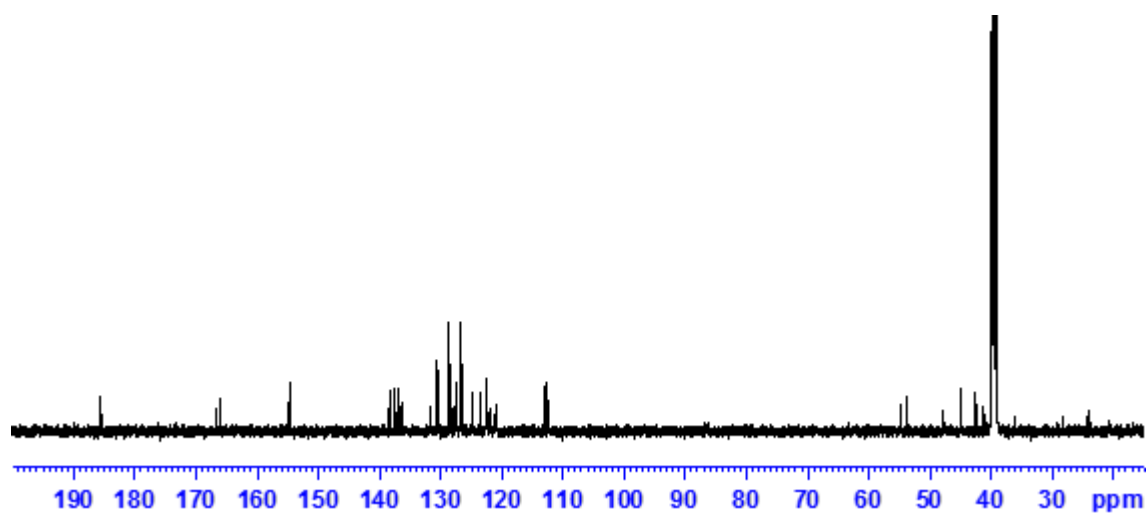


^{13}C RMN de 1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]-2-fenil-4-[2-(1H-indol-3-il)-oxoacetil]-piperazina (**70**)

Figura 27. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **70**.

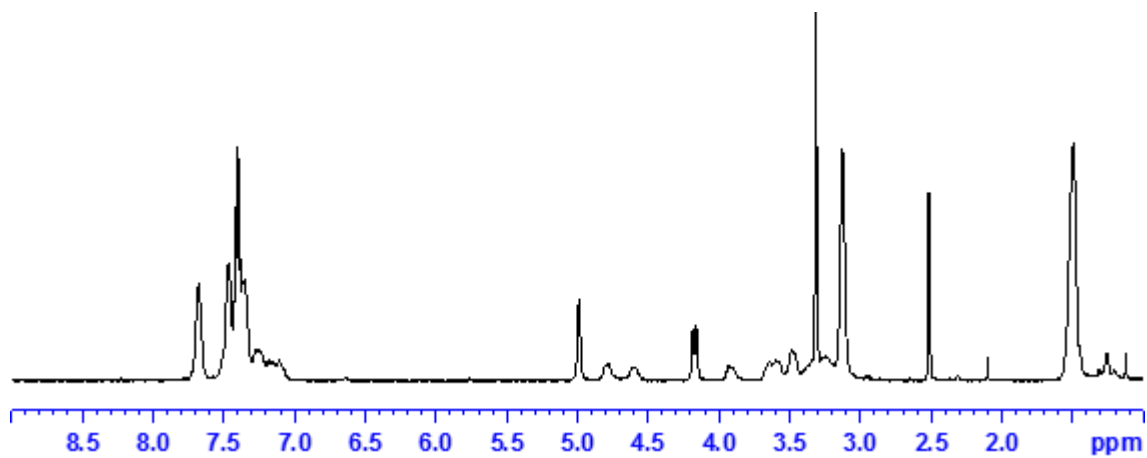


^1H RMN de 1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]- 2-fenil-4-[2-(1H-indol-3-il)-oxoacetil]-piperazina (**71**)

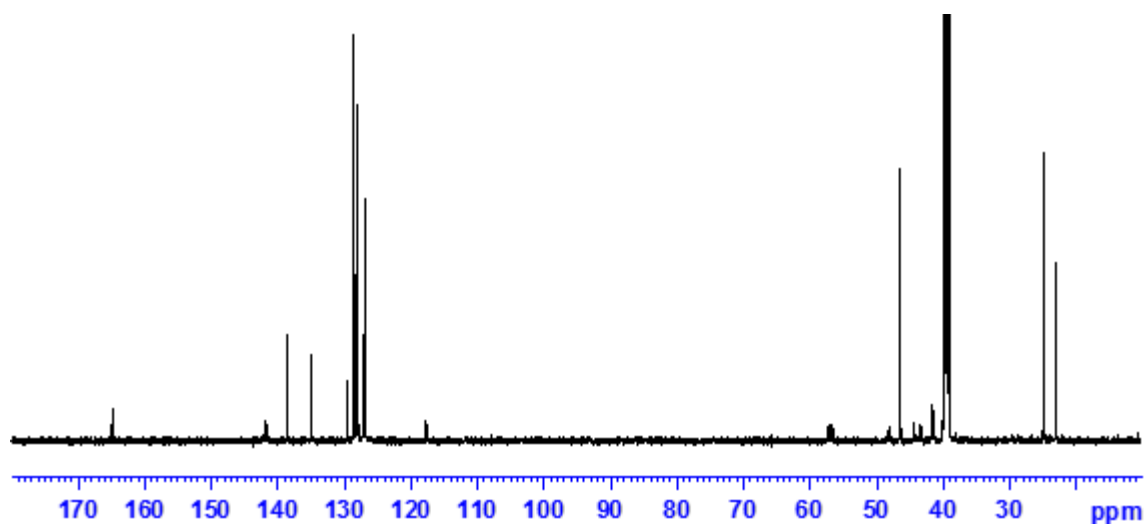


^{13}C RMN de 1-[(4-Acetilfenil)aminocarbonil]- 2-fenil-4-[2-(1H-indol-3-il)-oxoacetil]-piperazina (**71**)

Figura 28. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **71**.



¹H RMN de (E)-4-cinamil-3-fenil-1-(piperidin-1-il-sulfonil)piperazina (**72**)



¹³C RMN de (E)-4-cinamil-3-fenil-1-(piperidin-1-il-sulfonil)piperazina (**72**)

Figura 29. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **72**.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lion, T. (2014) Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 27 (3), 441-462
- 2 Echavarria, M. (2008) Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 21 (4), 704-715
- 3 Metzgar, D. et al. (2010) Evaluation of multiplex type-specific real-time PCR assays using the LightCycler and joint biological agent identification and diagnostic system platforms for detection and quantitation of adult human respiratory adenoviruses. *J Clin Microbiol* 48 (4), 1397-1403
- 4 Robinson, C.M. et al. (2011) Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 11 (6), 1208-1217
- 5 Menon, B.B. et al. (2016) Epidemic Keratoconjunctivitis-Causing Adenoviruses Induce MUC16 Ectodomain Release To Infect Ocular Surface Epithelial Cells. *mSphere* 1 (1)
- 6 Cooper, R.J. et al. (2000) The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 125 (2), 333-345
- 7 Jones, M.S., 2nd et al. (2007) New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 81 (11), 5978-5984
- 8 Walls, T. et al. (2003) Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 3 (2), 79-86
- 9 Mitra, A.K. and Clarke, K. (2010) Viral obesity: fact or fiction? *Obes Rev* 11 (4), 289-296
- 10 Ponterio, E. and Gnassi, L. (2015) Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses* 7 (7), 3719-3740
- 11 Arnberg, N. (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci* 33 (8), 442-448
- 12 Signas, C. et al. (1985) Adenovirus 3 fiber polypeptide gene: implications for the structure of the fiber protein. *J Virol* 53 (2), 672-678
- 13 Green, N.M. et al. (1983) Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *EMBO J* 2 (8), 1357-1365
- 14 Saban, S.D. et al. (2006) Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *J Virol* 80 (24), 12049-12059

- 15 Smith, J.G. et al. (2010) Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 343, 195-224
- 16 Wiethoff, C.M. et al. (2005) Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 79 (4), 1992-2000
- 17 Chatterjee, P.K. et al. (1985) Interactions among the three adenovirus core proteins. *J Virol* 55 (2), 379-386
- 18 Robinson, A.J. et al. (1979) Replicating adenovirus 2 DNA molecules contain terminal protein. *Virology* 96 (1), 143-158
- 19 Vayda, M.E. et al. (1983) The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions. *Nucleic Acids Res* 11 (2), 441-460
- 20 Vayda, M.E. and Flint, S.J. (1987) Isolation and characterization of adenovirus core nucleoprotein subunits. *J Virol* 61 (10), 3335-3339
- 21 Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1998) Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J Gen Virol* 79 (Pt 7), 1671-1675
- 22 Zhang, W. and Imperiale, M.J. (2000) Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences. *J Virol* 74 (6), 2687-2693
- 23 Tribouley, C. et al. (1994) The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. *J Virol* 68 (7), 4450-4457
- 24 Mangel, W.F. and San Martin, C. (2014) Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses* 6 (11), 4536-4570
- 25 Robinson, C.M. et al. (2013) Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep* 3, 1812
- 26 Endter, C. and Dobner, T. (2004) Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 273, 163-214
- 27 Russell, W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81 (Pt 11), 2573-2604
- 28 Nemajerova, A. et al. (2008) Rb function is required for E1A-induced S-phase checkpoint activation. *Cell Death Differ* 15 (9), 1440-1449
- 29 Roth, J. and Dobbelstein, M. (2003) Interaction of p53 with the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Methods Mol Biol* 234, 135-149

- 30 White, E. (2001) Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene* 20 (54), 7836-7846
- 31 Horwitz, M.S. (2004) Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J Gene Med* 6 Suppl 1, S172-183
- 32 Weitzman, M.D. (2005) Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front Biosci* 10, 1106-1117
- 33 Lutz, P. et al. (1997) The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol* 71 (7), 5102-5109
- 34 Lutz, P. and Keding, C. (1996) Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J Virol* 70 (3), 1396-1405
- 35 Hoeben, R.C. and Uil, T.G. (2013) Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (3), a013003
- 36 Giberson, A.N. et al. (2012) Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res* 40 (6), 2369-2376
- 37 Nagata, K. et al. (1983) Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full-length DNA with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (14), 4266-4270
- 38 Komatsu, T. and Nagata, K. (2012) Replication-uncoupled histone deposition during adenovirus DNA replication. *J Virol* 86 (12), 6701-6711
- 39 Andersson, M.G. et al. (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79 (15), 9556-9565
- 40 Nemerow, G.R. et al. (2009) Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* 384 (2), 380-388
- 41 Gaggar, A. et al. (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9 (11), 1408-1412
- 42 Bergelson, J.M. et al. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275 (5304), 1320-1323
- 43 Wang, H. et al. (2011) Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17 (1), 96-104

- 44 Trinh, H.V. et al. (2012) Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J Virol* 86 (3), 1623-1637
- 45 Lyle, C. and McCormick, F. (2010) Integrin alphavbeta5 is a primary receptor for adenovirus in CAR-negative cells. *Viol J* 7, 148
- 46 Suomalainen, M. et al. (2013) A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. *J Virol* 87 (22), 12367-12379
- 47 Greber, U.F. et al. (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75 (3), 477-486
- 48 Suomalainen, M. et al. (1999) Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144 (4), 657-672
- 49 Zhang, L. et al. (2016) Virology and epidemiology analyses of global adenovirus-associated conjunctivitis outbreaks, 1953-2013. *Epidemiol Infect* 144 (8), 1661-1672
- 50 Schmitz, H. et al. (1983) Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 117 (4), 455-466
- 51 Sanaei Dashti, A. et al. (2016) Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. *Gastroenterol Res Pract* 2016, 2045697
- 52 Kramer, A. et al. (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6, 130
- 53 Kolavic-Gray, S.A. et al. (2002) Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin Infect Dis* 35 (7), 808-818
- 54 Chen, Y. et al. (2016) Molecular Identification and Epidemiological Features of Human Adenoviruses Associated with Acute Respiratory Infections in Hospitalized Children in Southern China, 2012-2013. *PLoS One* 11 (5), e0155412
- 55 Lyman, W.H. et al. (2009) Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *J Pediatr* 154 (2), 253-257
- 56 Lenaerts, L. et al. (2008) Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 18 (6), 357-374

- 57** Tan, D. et al. (2016) Severe Community-Acquired Pneumonia Caused by Human Adenovirus in Immunocompetent Adults: A Multicenter Case Series. *PLoS One* 11 (3), e0151199
- 58** Gadsby, N.J. et al. (2016) Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis* 62 (7), 817-823
- 59** Kajon, A.E. and Ison, M.G. (2016) Severe Infections with Human Adenovirus 7d in 2 Adults in Family, Illinois, USA, 2014. *Emerg Infect Dis* 22 (4), 730-733
- 60** Siminovich, M. and Murtagh, P. (2011) Acute lower respiratory tract infections by adenovirus in children: histopathologic findings in 18 fatal cases. *Pediatr Dev Pathol* 14 (3), 214-217
- 61** Zhang, S.Y. et al. (2016) Fatal pneumonia cases caused by human adenovirus 55 in immunocompetent adults. *Infect Dis (Lond)* 48 (1), 40-47
- 62** Hong, J.Y. et al. (2001) Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 32 (10), 1423-1429
- 63** Pacini, D.L. et al. (1987) Adenovirus infections and respiratory illnesses in children in group day care. *J Infect Dis* 156 (6), 920-927
- 64** Lu, M.P. et al. (2013) Clinical characteristics of adenovirus associated lower respiratory tract infection in children. *World J Pediatr* 9 (4), 346-349
- 65** Alharbi, S. et al. (2012) Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. *BMC Infect Dis* 12, 55
- 66** Mendiratta, P. et al. (2014) Extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure in the elderly: a review of the Extracorporeal Life Support Organization registry. *ASAIO J* 60 (4), 385-390
- 67** Kajon, A.E. et al. (2007) Molecular epidemiology of adenovirus type 4 infections in US military recruits in the postvaccination era (1997-2003). *J Infect Dis* 196 (1), 67-75
- 68** Kushner, R.A. et al. (2013) A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral

- adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine* 31 (28), 2963-2971
- 69** Tan, D. et al. (2016) Severe adenovirus community-acquired pneumonia in immunocompetent adults: chest radiographic and CT findings. *J Thorac Dis* 8 (5), 848-854
- 70** Clark, T.W. et al. (2011) Severe community-acquired adenovirus pneumonia in an immunocompetent 44-year-old woman: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 5, 259
- 71** Kim, S.J. et al. (2015) Outcomes of early administration of cidofovir in non-immunocompromised patients with severe adenovirus pneumonia. *PLoS One* 10 (4), e0122642
- 72** Verma, H. et al. (2009) Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. *J Med Virol* 81 (1), 60-64
- 73** Meyer-Rusenber, B. et al. (2011) Epidemic keratoconjunctivitis: the current situation and recommendations for prevention and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 108 (27), 475-480
- 74** Garnett, C.T. et al. (2009) Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol* 83 (6), 2417-2428
- 75** Garnett, C.T. et al. (2002) Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 76 (21), 10608-10616
- 76** de Jong, P.J. et al. (1983) Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1 (8337), 1293-1296
- 77** Mahr, J.A. and Gooding, L.R. (1999) Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev* 168, 121-130
- 78** Wold, W.S. et al. (1999) Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol* 11 (4), 380-386
- 79** Wold, W.S. et al. (1994) Adenovirus proteins that subvert host defenses. *Trends Microbiol* 2 (11), 437-443
- 80** Gooding, L.R. and Wold, W.S. (1990) Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit Rev Immunol* 10 (1), 53-71

- 81 Al-Herz, W. and Moussa, M.A. (2012) Survival and predictors of death among primary immunodeficient patients: a registry-based study. *J Clin Immunol* 32 (3), 467-473
- 82 Lindemans, C.A. et al. (2010) How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 116 (25), 5476-5485
- 83 Verdeguer, A. et al. (2011) Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant* 46 (1), 119-124
- 84 Bil-Lula, I. et al. (2010) Hematuria due to adenoviral infection in bone marrow transplant recipients. *Transplant Proc* 42 (9), 3729-3734
- 85 Ison, M.G. (2006) Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 43 (3), 331-339
- 86 Seidemann, K. et al. (2004) Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: report of six cases and review of the literature. *Am J Transplant* 4 (12), 2102-2108
- 87 Kojaoghlanian, T. et al. (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13 (3), 155-171
- 88 Bridges, N.D. et al. (1998) Adenovirus infection in the lung results in graft failure after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116 (4), 617-623
- 89 Florescu, D.F. et al. (2013) Adenovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 4, 206-211
- 90 Flomenberg, P. et al. (1994) Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 169 (4), 775-781
- 91 Bordigoni, P. et al. (2001) Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 32 (9), 1290-1297
- 92 Long, S.S. et al. (2008) *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, Churchill Livingstone/Elsevier
- 93 Matthes-Martin, S. et al. (2013) Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11 (10), 1017-1028

- 94** Patel, R.V. and Park, S.W. (2013) An evolving role of piperazine moieties in drug design and discovery. *Mini Rev Med Chem* 13 (11), 1579-1601
- 95** Taylor, R.D. et al. (2014) Rings in drugs. *J Med Chem* 57 (14), 5845-5859
- 96** Chetan, B. et al. (2010) Design, synthesis and anticancer activity of piperazine hydroxamates and their histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (13), 3906-3910
- 97** Wang, S. et al. (2012) Synthesis, antimycobacterial and antibacterial activity of ciprofloxacin derivatives containing a N-substituted benzyl moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 22 (18), 5971-5975
- 98** Mayence, A. et al. (2004) Parallel solution-phase synthesis of conformationally restricted congeners of pentamidine and evaluation of their antiplasmodial activities. *J Med Chem* 47 (10), 2700-2705
- 99** Fytas, C. et al. (2011) Novel lipophilic acetohydroxamic acid derivatives based on conformationally constrained spiro carbocyclic 2,6-diketopiperazine scaffolds with potent trypanocidal activity. *J Med Chem* 54 (14), 5250-5254
- 100** Mayence, A. et al. (2004) Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 39 (6), 547-553
- 101** Romero, D.L. et al. (1993) Bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships of novel substituted indole analogues and the identification of 1-[(5-methanesulfonamido-1H-indol-2-yl)-carbonyl]-4-[3-[(1-methylethyl)amino]-pyridinyl]piperazine monomethanesulfonate (U-90152S), a second-generation clinical candidate. *J Med Chem* 36 (10), 1505-1508
- 102** Banerjee, D. et al. (2011) Novel isatinyl thiosemicarbazones derivatives as potential molecule to combat HIV-TB co-infection. *Eur J Med Chem* 46 (1), 106-121
- 103** Wang, T. et al. (2009) Inhibitors of HIV-1 attachment. Part 4: A study of the effect of piperazine substitution patterns on antiviral potency in the context of indole-based derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 19 (17), 5140-5145

- 104** Chen, X. et al. (1998) Potent piperazine hydroxyethylamine HIV protease inhibitors containing novel P3 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 8 (24), 3531-3536
- 105** Dou, D. et al. (2012) Inhibition of noroviruses by piperazine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 22 (1), 377-379
- 106** Wang, H. et al. (2011) Pharmacophore-based design, synthesis, and biological evaluation of novel chloro-pyridazine piperazines as human rhinovirus (HRV-3) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 21 (3), 1057-1059
- 107** He, S. et al. (2016) Discovery, Optimization, and Characterization of Novel Chlorcyclizine Derivatives for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *J Med Chem* 59 (3), 841-853
- 108** Sanchez-Céspedes, J. et al. (2014) Inhibition of adenovirus replication by a trisubstituted piperazin-2-one derivative. *Antiviral Res* 108, 65-73
- 109** Weber, J. (1976) Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J Virol* 17 (2), 462-471
- 110** Greber, U.F. (1998) Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Rev Med Virol* 8 (4), 213-222
- 111** Greber, U.F. et al. (1996) The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J* 15 (8), 1766-1777
- 112** Chen, P.H. et al. (1993) The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J Virol* 67 (6), 3507-3514
- 113** Webster, A. et al. (1993) The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* 72 (1), 97-104
- 114** Baniecki, M.L. et al. (2001) Interaction of the human adenovirus proteinase with its 11-amino acid cofactor pVIc. *Biochemistry* 40 (41), 12349-12356
- 115** Ding, J. et al. (1996) Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO J* 15 (8), 1778-1783
- 116** Webster, A. and Kemp, G. (1993) The active adenovirus protease is the intact L3 23K protein. *J Gen Virol* 74 (Pt 7), 1415-1420
- 117** Graziano, V. et al. (2013) Regulation of a viral proteinase by a peptide and DNA in one-dimensional space: II. adenovirus proteinase is

- activated in an unusual one-dimensional biochemical reaction. *J Biol Chem* 288 (3), 2068-2080
- 118** Mangel, W.F. et al. (1996) Characterization of three components of human adenovirus proteinase activity in vitro. *J Biol Chem* 271 (1), 536-543
- 119** McGrath, W.J. et al. (2001) Human adenovirus proteinase: DNA binding and stimulation of proteinase activity by DNA. *Biochemistry* 40 (44), 13237-13245
- 120** McGrath, W.J. et al. (2013) First generation inhibitors of the adenovirus proteinase. *FEBS Lett* 587 (15), 2332-2339
- 121** Pang, Y.P. et al. (2001) Discovery of a new inhibitor lead of adenovirus proteinase: steps toward selective, irreversible inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 502 (3), 93-97
- 122** Sircar, S. et al. (1996) Inhibition of adenovirus infection with protease inhibitors. *Antiviral Res* 30 (2-3), 147-153
- 123** Brown, M.T. et al. (1996) Different modes of inhibition of human adenovirus proteinase, probably a cysteine proteinase, by bovine pancreatic trypsin inhibitor. *FEBS Lett* 388 (2-3), 233-237
- 124** Pflugrath, J.W. (1999) The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 10), 1718-1725
- 125** Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 1), 22-25
- 126** Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (Pt 12 Pt 1), 2126-2132
- 127** Murshudov, G.N. et al. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67 (Pt 4), 355-367
- 128** Joosten, R.P. et al. (2014) The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ* 1 (Pt 4), 213-220
- 129** McGrath, W.J. et al. (2003) Crystallographic structure at 1.6-Å resolution of the human adenovirus proteinase in a covalent complex with its 11-amino-acid peptide cofactor: insights on a new fold. *Biochim Biophys Acta* 1648 (1-2), 1-11

- 130** Lion, T. et al. (2010) Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 24 (4), 706-714
- 131** Zhang, X. et al. (2013) Novel substituted heteroaromatic piperazine and piperidine derivatives as inhibitors of human enterovirus 71 and coxsackievirus a16. *Molecules* 18 (5), 5059-5071
- 132** Genin, M.J. et al. (1996) Synthesis and bioactivity of novel bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships and increased metabolic stability of novel substituted pyridine analogs. *J Med Chem* 39 (26), 5267-5275
- 133** Liu, T. et al. (2013) Design, synthesis and biological evaluation of novel piperazine derivatives as CCR5 antagonists. *PLoS One* 8 (1), e53636
- 134** Wang, J. et al. (2005) Modification and structure-activity relationship of a small molecule HIV-1 inhibitor targeting the viral envelope glycoprotein gp120. *Org Biomol Chem* 3 (9), 1781-1786
- 135** Lee, A.M. et al. (2008) Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses. *J Biol Chem* 283 (27), 18734-18742
- 136** Koca, I. et al. (2013) Synthesis and anticancer activity of acyl thioureas bearing pyrazole moiety. *Bioorg Med Chem* 21 (13), 3859-3865
- 137** Vega-Perez, J.M. et al. (2012) Isoprenyl-thiourea and urea derivatives as new farnesyl diphosphate analogues: synthesis and in vitro antimicrobial and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem* 58, 591-612
- 138** Kumbhare, R.M. et al. (2012) Synthesis and cytotoxic evaluation of thiourea and N-bis-benzothiazole derivatives: a novel class of cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 22 (1), 453-455
- 139** Li, W.Q. et al. (2013) Design, synthesis and potent cytotoxic activity of novel podophyllotoxin derivatives. *Bioorg Med Chem* 21 (8), 2363-2369
- 140** Di Grandi, M.J. et al. (2004) Thiourea inhibitors of herpesviruses. Part 3: Inhibitors of varicella zoster virus. *Bioorg Med Chem Lett* 14 (16), 4157-4160
- 141** Bloom, J.D. et al. (2004) Thiourea inhibitors of herpes viruses. Part 2: N-Benzyl-N'-arylthiourea inhibitors of CMV. *Bioorg Med Chem Lett* 14 (13), 3401-3406

- 142** Bloom, J.D. et al. (2003) Thiourea inhibitors of herpes viruses. Part 1: bis-(aryl)thiourea inhibitors of CMV. *Bioorg Med Chem Lett* 13 (17), 2929-2932
- 143** Oberg, C.T. et al. (2012) Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of 2-[2-(benzoylamino)benzoylamino]benzoic acid analogues as inhibitors of adenovirus replication. *J Med Chem* 55 (7), 3170-3181
- 144** Judge, V. et al. (2012) Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activities, and QSAR studies of isonicotinic acid-1-(substituted phenyl)-ethylidene/cycloheptylidene hydrazides. *Medicinal Chemistry Research* 21 (8), 1935-1952
- 145** Debnath, A.K. (2003) Generation of predictive pharmacophore models for CCR5 antagonists: study with piperidine- and piperazine-based compounds as a new class of HIV-1 entry inhibitors. *J Med Chem* 46 (21), 4501-4515
- 146** Tagat, J.R. et al. (2004) Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]- 4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperazinyl]- 4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist. *J Med Chem* 47 (10), 2405-2408
- 147** Bremner, K.H. et al. (2009) Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* 6 (6), 523-535
- 148** Strunze, S. et al. (2011) Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host Microbe* 10 (3), 210-223
- 149** Griffiths, P. and Lumley, S. (2014) Cytomegalovirus. *Curr Opin Infect Dis* 27 (6), 554-559
- 150** Prichard, M.N. et al. (2011) Benzimidazole analogs inhibit human herpesvirus 6. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (5), 2442-2445
- 151** Schleiss, M.R. et al. (2005) The non-nucleoside antiviral, BAY 38-4766, protects against cytomegalovirus (CMV) disease and mortality in immunocompromised guinea pigs. *Antiviral Res* 65 (1), 35-43

- 152** Wu, G. et al. (2013) Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (11), 5344-5354
- 153** Hoffmann, H.H. et al. (2011) Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (14), 5777-5782
- 154** Schaack, J. et al. (1991) Adenovirus E1A protein activates transcription of the E1A gene subsequent to transcription complex formation. *J Virol* 65 (4), 1687-1694
- 155** Shi, R. et al. (2006) Three-dimensional modeling of cytomegalovirus DNA polymerase and preliminary analysis of drug resistance. *Proteins* 64 (2), 301-307
- 156** Brenkman, A.B. et al. (2002) Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer. *J Virol* 76 (16), 8200-8207
- 157** Liu, H. et al. (2000) Identification of conserved residues contributing to the activities of adenovirus DNA polymerase. *J Virol* 74 (24), 11681-11689
- 158** Doerfler, W. et al. (1995) The Molecular Repertoire of Adenoviruses II Molecular Biology of Virus-Cell Interactions. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 1 online resource., Springer Berlin Heidelberg,
- 159** Ying, B. et al. (2014) Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 58 (12), 7171-7181
- 160** Grosche, P. et al. (2015) Structure-based design and optimization of potent inhibitors of the adenoviral protease. *Bioorg Med Chem Lett* 25 (3), 438-443
- 161** Ndao, M. et al. (2013) A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (12), 6063-6073
- 162** Vermeire, J.J. et al. (2012) Cure of hookworm infection with a cysteine protease inhibitor. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (7), e1680
- 163** Jacobsen, W. et al. (2000) In vitro evaluation of the disposition of A novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metab Dispos* 28 (11), 1343-1351

- 164** Ettari, R. et al. (2009) Novel peptidomimetics containing a vinyl ester moiety as highly potent and selective falcipain-2 inhibitors. *J Med Chem* 52 (7), 2157-2160
- 165** Rasnick, D. (1985) Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. *Anal Biochem* 149 (2), 461-465
- 166** Powers, J.C. et al. (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 102 (12), 4639-4750
- 167** Sarnow, P. et al. (1982) Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J Mol Biol* 162 (3), 565-583
- 168** Downey, J.F. et al. (1983) Mapping of a 14,000-dalton antigen to early region 4 of the human adenovirus 5 genome. *J Virol* 45 (2), 514-523
- 169** Doucas, V. et al. (1996) Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10 (2), 196-207
- 170** Hoppe, A. et al. (2006) Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *J Virol* 80 (6), 3042-3049
- 171** Shepard, R.N. and Ornelles, D.A. (2003) E4orf3 is necessary for enhanced S-phase replication of cell cycle-restricted subgroup C adenoviruses. *J Virol* 77 (15), 8593-8595
- 172** Wu, K. et al. (2013) The adenovirus L4-33K protein regulates both late gene expression patterns and viral DNA packaging. *J Virol* 87 (12), 6739-6747
- 173** Brown, M.T. and Mangel, W.F. (2004) Interaction of actin and its 11-amino acid C-terminal peptide as cofactors with the adenovirus proteinase. *FEBS Lett* 563 (1-3), 213-218
- 174** Staufenbiel, M. et al. (1986) Progressive reorganization of the host cell cytoskeleton during adenovirus infection. *J Virol* 60 (3), 1186-1191
- 175** Wang, J. et al. (2015) Profiling the interaction mechanism of indole-based derivatives targeting the HIV-1 gp120 receptor. *RSC Advances* 5 (95), 78278-78298

- 176** Lavrado, J. et al. (2012) Antitrypanosomal and cysteine protease inhibitory activities of alkyl diamine cryptolepine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 22 (19), 6256-6260
- 177** Sarabia, F. et al. (2005) Stereoselective synthesis of E-64 and related cysteine proteases inhibitors from 2,3-epoxyamides. *Bioorg Med Chem* 13 (5), 1691-1705
- 178** Mangel, W.F. et al. (2003) Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin. *Cell Mol Life Sci* 60 (11), 2347-2355
- 179** Hassell, A.M. et al. (2007) Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63 (Pt 1), 72-79
- 180** Wermuth, C.G. (2008) *The practice of medicinal chemistry*, Elsevier/Academic
- 181** Nadassy, K. et al. (1999) Structural features of protein-nucleic acid recognition sites. *Biochemistry* 38 (7), 1999-2017
- 182** Jones, N. and Shenk, T. (1979) Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* 17 (3), 683-689
- 183** Nevels, M. et al. (1999) Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol* 73 (2), 1591-1600
- 184** Kindsmuller, K. et al. (2007) Intracellular targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (16), 6684-6689
- 185** Russo Krauss, I. et al. (2013) An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci* 14 (6), 11643-11691